

# **Eine Methode zur direkten Identifizierung chromosomaler Translokationsbruchpunkte**

## **Dissertation**

der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Susanne Steinhaus  
aus Köln

Dissertation eingereicht	04. 04. 2007
Erster Berichterstatter	Prof. Dr. T. Cremer
Zweiter Berichterstatter	Prof. Dr. E. Weiß
Tag der mündlichen Prüfung	24. 10. 2007

Für meine Eltern

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der entsprechenden Literaturzitate gekennzeichnet. Die vorliegende Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, April 2007

Susanne Steinhaus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1	Strukturelle Chromosomenaberrationen hämatologischer Tumore.....	8
1.2	Strukturelle Chromosomenaberrationen epithelialer Tumore .....	9
1.3	Entstehung von Translokationen.....	10
1.4	Techniken zur Analyse von Chromosomenaberrationen.....	14
1.5	Ziel der Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1	Material .....	18
2.1.1	Chemikalien .....	18
2.1.2	Enzyme.....	19
2.1.3	Verbrauchsmaterialien .....	19
2.1.4	Geräte.....	20
2.1.5	Puffer, Lösungen und Medien .....	21
2.2	Endonuklease-Reaktionen.....	22
2.2.1	Mse I-Verdau .....	22
2.2.2	Fraktionierungsverdau mit Dra I, Ksp AI, Vsp I und Bsp TI .....	22
2.2.3	MBN-Verdau.....	22
2.3	Oligonukleotid-Adapter .....	22
2.3.1	Annealing-Reaktion .....	22
2.3.2	Ligationsverfahren .....	23
2.3.2.1	Standardligation.....	23
2.3.2.2	Quick Ligation.....	24
2.3.3	Auffüllen von Oligonukleotid-Adaptern .....	24
2.3.3.1	Standard-Auffüllreaktion .....	24
2.3.3.2	Auffüllreaktion an paramagnetischen Partikeln.....	24
2.4	Polymerase Kettenreaktionen (PCR) .....	25
2.4.1	Spezifische Kontroll-PCR .....	25
2.4.2	Fraktionierungs-PCR.....	26
2.4.2.1	Fraktionierung mittels mismatch-Primern .....	26
2.4.2.2	Fraktionierung mittels fraktionsspezifischer Adapter.....	27
2.4.2.2.1	Fraktionierung mit MBN-Verdau .....	27
2.4.2.2.2	Fraktionierung mit Hot-Start.....	27
2.4.3	Reamplifizierung und J20n-PCR.....	28
2.4.3.1	Reamplifizierung .....	28
2.4.3.2	J20n-PCR.....	29
2.4.4	Quantitative PCR .....	30
2.5	Gelelektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.5.1	Gelelektrophorese .....	30
2.5.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	30
2.5.1.2	Acrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.5.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren.....	31
2.5.2.1	Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen .....	31
2.5.2.2	Phenol/Chloroform-Extraktion .....	31
2.5.2.3	Fällung von Nukleinsäuren.....	31
2.5.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.6	Transformation kompetenter Bakterien .....	32
2.6.1	Chemokompetente Bakterien .....	32
2.6.2	Transformation.....	32
2.6.3	Screening-PCR und Plasmidpräparation .....	33
2.7	Nachweis von Zielsequenzen mittels spezifischer DNA-Sonden .....	33

2.7.1	Southern-Blot .....	34
2.7.2	Hybridisierung von spezifischen DNA-Sonden .....	34
2.8	<i>Genomische Mse I-Repräsentationen</i> .....	35
2.9	<i>Testsysteme zur Methodenetablierung</i> .....	35
2.9.1	Das BCR-ABL Bruchpunktfragment als differentielle Sequenz .....	35
2.9.1.1	Isolieren des BCR-ABL Fragments aus dem K562-Genom .....	36
2.9.2	Mse I-Fragmente aus GFP als differentielle Sequenzen .....	37
2.9.2.1	Isolieren von Mse I-Fragmenten aus dem GFP-Gen .....	37
2.9.3	Herstellen von Tester- und Driverpools .....	39
2.9.4	Testsystem BCR-ABL und Testsystem GFPmut I .....	39
2.9.5	Testsystem GFPmut II .....	40
2.9.6	Absolute Quantifizierung eines humanen single copy Gens .....	40
2.10	<i>Arbeiten mit paramagnetischen Partikeln</i> .....	41
2.10.1	Positivselektion durch PCR-Produkt-Kopplung .....	42
2.10.2	Positivselektion durch Ligationskopplung .....	42
2.10.2.1	Kopplung von markierten Oligonukleotid-Adaptoren .....	42
2.10.2.2	Waschprotokoll für paramagnetische Partikel .....	43
2.10.3	Silanisierung von PCR-Reaktionsgefäßen .....	44
2.11	<i>Subtraktion</i> .....	44
2.11.1	Subtraktive Hybridisierung .....	44
2.11.2	Subtraktive PCR .....	45
2.12	<i>Elektronische Datenbankrecherche</i> .....	46
2.13	<i>Gesamtprotokoll zum experimentellen Vorgehen</i> .....	47
2.13.1	Fraktionierung eines Genoms .....	47
2.13.2	Subtraktion von fraktionierten Genomen .....	50
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>51</b>
3.1	<i>Einführung in die Fraktionierung</i> .....	51
3.1.1	Die Einteilung der Fraktionen: Differenzierungsbasen .....	52
3.1.2	Grundmechanismen der Fraktionierung .....	53
3.1.3	Kontrolle des Fraktionierungserfolges .....	54
3.1.3.1	Nachweisgrenze der Kontroll-PCR .....	55
3.1.3.2	Auswerteverfahren zur Analyse der Fraktionen .....	57
3.2	<i>Fraktionierung durch fraktionsspezifische Adapter</i> .....	58
3.2.1	Einfache Fraktionen .....	60
3.2.1.1	Schritte 1-4: Vorbereitung und J20n-PCR .....	60
3.2.1.2	Schritt 5: Fraktionierungsverdau .....	61
3.2.1.3	Schritt 6: Ligation fraktionsspezifischer 26R-Adapter .....	62
3.2.1.4	Schritt 7: Positivselektion an paramagnetischen Partikeln .....	64
3.2.1.5	Schritte 8 - 10: Anreichern einer Fraktion .....	66
3.2.1.5.1	Einfluss der 23R'-Primersequenz .....	66
3.2.1.5.2	MBN-Verdau .....	68
3.2.2	Überblick und Reproduzierbarkeit (Einfache Fraktionen) .....	70
3.2.3	Gemischte Fraktionen .....	72
3.2.3.1	Gemischte Fraktionierung durch zweifache Positivselektion .....	73
3.2.3.1.1	Zweifache Positivselektion mit Markierungs-PCR .....	73
3.2.3.1.2	Zweifache Positivselektion mit Zwischen-PCR .....	76
3.2.3.1.3	Zweifache Positivselektion in direkter Folge .....	77
3.2.3.2	Gemischte Fraktionierung mit Inhibition .....	79
3.2.3.2.1	Suppressions-PCR .....	79
3.2.3.2.2	Gemischte Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter .....	82
3.2.4	Überblick und Reproduzierbarkeit (Gemischte Fraktionen) .....	86
3.2.5	Überblick über die Reinheit der Fraktionen .....	87
3.3	<i>Verlust von Fragmenten während der Fraktionierung</i> .....	88
3.4	<i>Einführung in die Subtraktion</i> .....	91
3.4.1	Testsysteme für die Subtraktion .....	93

3.4.1.1	BCR-ABL Testsystem .....	94
3.4.1.2	GFPmut Testsystem .....	95
3.4.2	Erfolgreiche Subtraktionen: Isolierung differentieller Tester-Fragmente .....	96
3.4.2.1	Testsystem GFPmut I .....	96
3.4.2.2	Testsystem GFPmut II .....	99
3.4.2.3	BCR-ABL Testsystem .....	101
3.4.3	Falsch positive Subtraktionsergebnisse .....	103
3.4.3.1	Eliminieren von falsch positiven Ergebnissen .....	107
3.4.3.1.1	Verwendung eines Drivers aus mehreren Fraktionen .....	107
3.4.3.1.2	Verwendung von C <sub>0</sub> t-1 DNA .....	110
3.4.3.1.3	Verwendung von fraktionsspezifischen repetitiven DNA-Sequenzen .....	111
3.4.4	Identifizierung eines mutmaßlichen Translokationsbruchpunktes .....	113
3.5	Anhang zum Ergebnisteil: Fraktionierung durch fraktionsspezifische Primer .....	117
3.5.1	Verkürzte Fraktionierungsprimer .....	117
3.5.2	Mismatch-Fraktionierungsprimer .....	118
3.5.3	Einfache Fraktionen .....	120
3.5.3.1	Einfluss der Primersequenz und der Templatekonzentration .....	120
3.5.3.2	Einfluss von dNTP- und Primermenge .....	122
3.5.3.3	Einfluss der Annealing-Temperatur .....	123
3.5.3.4	Einfluss der Anzahl von PCR-Zyklen .....	125
3.5.4	Überblick und Reproduzierbarkeit (Einfache Fraktionen) .....	126
3.5.5	Gemischte Fraktionen .....	126
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>129</b>
4.1	Eine Translokation als Ausgangspunkt einer Zielgerichteten Therapie .....	129
4.2	Translokationen in epithelialen Tumoren .....	129
4.3	Nachweismethoden für Chromosomenaberrationen .....	130
4.4	Entwicklung einer neuen Nachweismethode von Translokationsbruchpunkten .....	132
4.4.1	Vergleich der neuen Nachweismethode mit der RDA .....	132
4.4.2	Bewertung der Fraktionierung .....	134
4.4.3	Bewertung der Subtraktion .....	136
4.4.3.1	Nachweisgrenze von differentiellen Fragmenten .....	136
4.4.3.2	Falsch positive Subtraktionsergebnisse .....	137
4.4.3.2.1	Falsch positive Ereignisse können durch die Fraktionierung begründet sein .....	138
4.4.3.2.2	Falsch positive Ergebnisse können durch Sequenzcharakteristika begründet sein .....	139
4.4.3.3	Identifizierung eines Fragments mit mutmaßlichem Translokationsbruchpunkt .....	140
4.5	Mögliche Bedeutung von Fusionsgenen in der Karzinogenese .....	143
4.5.1	Fusionsgene wirken Zelltyp-spezifisch .....	143
4.5.2	Ein Modell der Transformation von Epithelzellen durch Fusionsgene .....	144
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>146</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>154</b>
7.1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	154
7.2	Adapter und Oligonukleotide .....	154
7.2.1	Adapter .....	154
7.2.2	Oligonukleotide .....	155
7.2.3	Oligonukleotide für die spezifische Kontroll-PCR .....	156
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>159</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>160</b>

# 1 Einleitung

Jedes Jahr sterben in Deutschland mehr als 200.000 Menschen an Krebs. Im gleichen Zeitraum werden ca. 400.000 Neuerkrankungen registriert, von denen Tumore der Epithelien den größten Anteil stellen (Robert Koch-Institut). Obgleich sich die Möglichkeiten zur Therapie von Karzinompatienten in den letzten Jahren stark verbessert haben, ist es nicht zuletzt auf Grund der Heterogenität an biologischen Eigenschaften der Tumore häufig nicht möglich, Patienten vollständig zu heilen. Karzinome sind durch eine ungehemmte Proliferation, die Invasion in umliegendes Gewebe und eine mögliche Metastasierung gekennzeichnet. Der grundlegende Mechanismus der malignen Tumorentstehung ist die Transformation durch genetische Veränderungen, die in betroffenen Zellen u. a. zu Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren und Resistenz gegen Apoptose führen (Hanahan and Weinberg 2000).

Nach einem anerkannten Modell der Karzinogenese, das von Fearon und Vogelstein anhand von Untersuchungen zum Kolonkarzinom entwickelt wurde, wird für die maligne Transformation einer Kolonepithelzelle eine Akkumulation von mindestens fünf Mutationen benötigt (Fearon and Vogelstein 1990). Es wird vielfach angenommen, dass das initiiierende Ereignis in der Karzinogenese entweder eine Mutation eines Tumorsuppressorgens ist, die zum Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führt, oder eine Mutation eines Onkogens ist, die zu einer Aktivierung des Proteins führt (Hanahan and Weinberg 2000). Bei diesen frühen Mutationen kann es sich sowohl um Punktmutationen (van Wyk, Slezak et al. 2000) oder den Verlust der Heterozygotie (*loss of heterozygosity*, LOH) handeln (Luft, Gebert et al. 1999; Kurimoto, Gemma et al. 2001) als auch um epigenetische Phänomene wie eine Hypomethylierung des Genoms (Herath, Leggett et al. 2006) oder die Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen (Kim, Roh et al. 2005). Aus ihren Untersuchungen zur malignen Transformation humaner Fibroblasten folgern Hahn, Counter et al., dass wenige Genmutationen ohne zusätzliche Chromosomenaberrationen ausreichen, um Krebs auszulösen. Nach dem Einbringen von lediglich drei mutierten Genen - dem Immortalitätsgen *hTERT* und den Onkogenen *SV40 T-Antigen* und *H-ras* - entwickeln diese Zellen nach ca. 60 Teilungszyklen einen malignen Phänotyp (Hahn, Counter et al. 1999).

Im Gegensatz zu dieser Theorie steht die Aneuploidie-Hypothese von Duesberg (Duesberg and Li 2003). Danach verursachen nicht Genmutationen, sondern numerische Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) und die dadurch entstehende abnormale Dosis tausender Gene die malignen Phänotypen epithelialer Tumore. Die Aneuploidie entstehe dabei durch eine fehlerhafte Segregation der Chromosomen während der Mitose. Duesberg et al. fanden in 70% der von Hahn, Counter et al. untersuchten Zellen Aneuploidie, welche ihrer Meinung nach nicht nur die Ursache der malignen Transformation in diesem Modellsystem, sondern der grundlegende Mechanismus der Karzinogenese ist (Adeyinka, Kytola et al. 2000). Bereits vor fast einhundert Jahren stellte Boveri einen Zusammenhang zwischen der von ihm beobachteten Aneuploidie, dem Verlust der Zellpolarität und



defekten Zentrosomen in Krebszellen während der Mitose her (Boveri 1914, zitiert nach (Manchester 1995). Diese Beobachtungen werden unter anderem durch das Auftreten von Zentrosomen-Veränderungen in aneuploiden Adenokarzinomen der Brust gestützt (Lingle, Lutz et al. 1998).

## **1.1 Strukturelle Chromosomenaberrationen hämatologischer Tumore**

Generell wird davon ausgegangen, dass sich die Entstehung von hämatologischen und epithelialen Krebserkrankungen unterscheidet. Die Entstehung von hämatologischen Krebserkrankungen ist häufig direkt mit dem Auftreten von strukturellen Aberrationen der Chromosomen assoziiert. Nach DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen infolge einer fehlerhaften Fusion der Bruchpunkte Amplifikationen, Deletionen, Inversionen und Translokationen von Chromosomenabschnitten. Des Weiteren kann es zur Bildung von dizentrischen Chromosomen, Ring- und Isochromosomen kommen. Balancierte Strukturaberrationen (im Gegensatz zu nicht balancierten Aberrationen) führen nicht zum Verlust oder Gewinn genomischen Materials. Besonders bei Leukämien und Lymphomen sind balancierte Translokationen spezifisch mit bestimmten Tumorsubtypen und unterschiedlichen Prognosen für den Patienten assoziiert. Eine molekulare Charakterisierung solcher Veränderungen ergab, dass zumeist ein Fusionsgen mit neuer Funktion entsteht oder ein Gen fehlerhaft reguliert wird, welches im Bereich eines der beiden Bruchpunkte liegt. Ein Beispiel für letzteres ist die Translokation t(8;14) beim Burkitt-Lymphom. Dabei gerät das Onkogen *c-MYC* unter die Transkriptionskontrolle des Promotors vom Gen *IGH*, der die Expression der schweren Kette der Immunglobuline reguliert (Boxer and Dang 2001). Dies führt zu einer konstitutiven Aktivierung von *c-MYC* und infolgedessen zur malignen Transformation und klonalen Expansion der betroffenen Zelle.

Die Detektion von Fusionsgenen war für die Identifizierung von Genen wichtig, die als Onkogene an der Krebsentstehung beteiligt sind. So konnte gezeigt werden, dass das Produkt des *BCR-ABL* Fusionsgens infolge der Translokation t(9;22) durch eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität über 95% der Chronisch Myeloischen Leukämien und ca. 25 - 30% der Akuten Lymphoblastischen Leukämien verursacht (Levav-Cohen, Goldberg et al. 2005). In nicht-malignen Zellen ist die Kinase c-Abl an der Regulation wichtiger Prozesse wie der Reorganisierung des Aktinzytoskeletts, der Differenzierung und der Apoptoseinitiierung infolge von DNA-Schäden beteiligt (Kharas and Fruman 2005).

Wie bei Leukämien und Lymphomen gibt es auch bei Sarkomen einen engen Zusammenhang zwischen definierten Translokationen und den Tumorsubtypen, in denen sie auftreten. So wird beispielsweise in über 70% der alveolaren Rhabdomyosarkome (ARMS-Tumore) die Translokation t(2;13)(q35;q14) und das daraus resultierende Fusionsprotein PAX3-FKHR gefunden, in Ewing-Tumoren hauptsächlich die Translokation t(11;22)(q24;q12) und ihr Fusionsgen *EWS-FLII* (May, Gishizky et al. 1993; Scheidler, Fredericks et al. 1996; Xia and Barr 2004).

## 1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen epithelialer Tumore

Seltener als bei den hämatologischen Krebserkrankungen wurden spezifische Translokationen in epithelialen Tumorentitäten beschrieben. Jedoch sind beispielsweise die unterschiedlichen biologischen und klinischen Charakteristika von Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms jeweils mit bestimmten translozierten Genen assoziiert. Während beim papillären Schilddrüsenkarzinom meist eine der beiden Tyrosinkinasen RET oder NTRK fehlerhaft reguliert wird, ist bei der follikulären Form häufig die Regulation des Transkriptionsfaktors PAX8 verändert (Kroll, Sarraf et al. 2000). Die mucoepidermoide Form des Schilddrüsenkarzinoms wird durch die Translokation  $t(11;19)(q21;p13)$  ausgelöst, die über die Expression des Fusionsgens *MECT1-MAML2* die Transkription von Zielgenen des Transmembranrezeptors Notch konstitutiv aktiviert (Tonon, Modi et al. 2003). Die Aktivität von Notch reguliert u. a. Prozesse der Differenzierung und Proliferation, die für die Genese und Homöostase zahlreicher Organe benötigt werden (Artavanis-Tsakonas, Rand et al. 1999). Auch beim sekretorischen Mammakarzinom tritt häufig eine spezifische Translokation als einzige zytogenetische Veränderung auf. Tognon et al. wiesen bei 92% dieses seltenen infiltrierenden duktalen Karzinoms (IDC) die Expression des Fusionsproteins ETV6-NTRK3 als Folge der Translokation  $t(12;15)(p12;q26.1)$  nach. Da ein retroviraler Transfer des Fusionsgens murine Mammaepithelzellen transformieren kann, folgern die Autoren, dass es eine entscheidende Rolle für die Entwicklung eines sekretorischen Mammakarzinoms spielt (Tognon, Knezevich et al. 2002).

Einzelne auftretende Chromosomenaberrationen wie diese stellen in epithelialen Tumoren eine Ausnahme dar. In der Regel weisen diese das Phänomen der chromosomalen Instabilität (CIN) auf, das durch eine Vielzahl von Verlusten und Gewinnen ganzer Chromosomen oder Chromosomenarme charakterisiert ist (Lengauer, Kinzler et al. 1998). Eine der Ursachen für die CIN wird im fehlerhaften Ablauf der Mitose gesehen, was sich beispielsweise in multipolaren Spindelapparaten, abnormalen Zentrosomen oder nicht kondensierten Chromosomen äußert (Jallepalli and Lengauer 2001). Herath, Leggett et al. folgern aus der Analyse verschiedener Studien, dass die CIN einen von wenigstens zwei Mechanismen der malignen Transformation beim hepatozellulären Karzinom (HCC) darstellt (Herath, Leggett et al. 2006). Es ist allerdings weiterhin unklar, welche generelle Bedeutung die CIN für die Initiierung und das Wachstum von epithelialen Tumoren hat (Michor, Iwasa et al. 2005). Ein weiterer, mit *breakage-fusion-bridge* (BFB) bezeichneter Mechanismus, trägt zum Auftreten komplex veränderter, instabiler Karyotypen bei (McClintock 1951; Artandi and Attardi 2005). Bei diesem Prozess kommt es durch die Fusion von verkürzten Telomeren oder von Schwesterchromatiden nach einem Doppelstrangbruch zu dizentrischen Chromosomen, die während der folgenden Mitose auseinander brechen und einen Kreislauf so genannter BFB-Zyklen initiieren (Bailey and Murnane 2006).

Maligne Prostatazellen weisen häufig komplex veränderte Karyotypen auf, wobei die Anzahl an strukturellen Aberrationen während der Progression von der intraepithelialen Neoplasie (PIN) zum invasiven Karzinom zunimmt (Zitzelsberger, Engert et al. 2001; Beheshti, Vukovic et al. 2002).

Tomlins et al. konnten in bis zu 79% dieser Zellen Fusionen zwischen dem Gen *TMRSS2* und einem von drei Mitgliedern der Familie von ETS-Transkriptionsfaktoren nachweisen. Infolge der Genfusion führt ein androgenabhängiges Promotorelement aus *TMRSS2* zur Überexpression des Transkriptionsfaktors, dessen Bedeutung für die Tumorentstehung allerdings noch nicht demonstriert worden ist (Tomlins, Rhodes et al. 2005; Tomlins, Mehra et al. 2006).

### 1.3 Entstehung von Translokationen

Das häufige Auftreten von spezifischen Translokationen in Lymphomen und Leukämien hängt wahrscheinlich mit der V(D)J-Rekombination von Gensegmenten während der Lymphozytenreifung zusammen. Dieser physiologische Prozess ist notwendig, um die adaptive Immunantwort eines Organismus im notwendigen Maße variabel gestalten zu können. Dabei vermitteln kanonische Heptamer- und Nonamersequenzen gezielte Doppelstrangbrüche durch den RAG (*recombination activation gene*) Nuklease-Komplex (Hughes, Tillman et al. 2003). In B-Zellen werden daraufhin die Loci *IGH*, *IGL* und *IGK* für die Immunglobuline und in T-Zellen die Loci für die Ketten des T-Zell-Rezeptors umgeordnet. Die fehlerhafte Umordnung dieser Loci ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die Ursache von Translokationen in hämatologischen Tumoren.

Doppelstrangbrüche von DNA-Molekülen können auch exogen durch ionisierende Strahlung oder kanzerogene Stoffe induziert werden. Normale Zellen reagieren darauf mit einer Blockade des Zellzyklus und der Aktivierung von DNA-Reparatursystemen. Wird der Defekt im DNA-Molekül während des Zellzyklusarrest nicht repariert, kommt es zur Einleitung der Apoptose (Bernstein, Bernstein et al. 2002). Das komplexe Zusammenspiel von Detektion und Reparatur eines DNA-Doppelstrangbruchs sowie der Zellzyklusinhibition und Apoptoseinitiierung erhält die Integrität des Genoms auf chromosomaler und subchromosomaler Ebene aufrecht. Eine Störung in diesen Regelkreisen kann zu Mutagenese und maligner Transformation führen. Ein Zellzyklusarrest kann u. a. durch Hypoxie, eine Verkürzung der Telomere oder die Induktion des Tumorsuppressors *ARF* über die Akkumulation und Aktivierung des Kontrollproteins P53 ausgelöst werden (Graeber, Peterson et al. 1994; Counter 1996; Zindy, Williams et al. 2003). Nach den Erkenntnissen von Bartkova, Horejsi et al. ist die *DNA damage response* (DDR) ebenso wie diese Mechanismen eine weitere wichtige Kontrollinstanz zum Schutz vor prämaligen Läsionen. Dabei dient vor allem die Kinase ATM (*Ataxia-Telangiectasia mutated*) dem Aufspüren von Doppelstrangbrüchen und dem Prozessieren eines Signals zur Aktivierung von Reparaturmechanismen in der Zelle. Bartkova, Horejsi et al. zeigten, dass verschiedene Onkogene ATM aktivieren, welches daraufhin u. a. seine Effektorkinase Chk2, das Histon H2AX und P53 phosphoryliert. Bereits in Vorstufen von humanen Karzinomen konnte die Gruppe eine Aktivierung von ATM-abhängigen Signalwegen nachweisen (Bartkova, Horejsi et al. 2005). Nach der Aktivierung der *DNA damage response* werden in der Evolution konservierte Mechanismen zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen in Gang gesetzt: Die nicht-

homologe Endverknüpfung (*Non Homologous End Joining*, NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) (Bassing and Alt 2004).

Obwohl die NHEJ oft mit der Deletion oder Amplifikation einiger Nukleotide einhergeht, ist sie bei Vertebraten der vorherrschende Mechanismus zur Wiederverknüpfung von DNA-Enden (Lieber, Ma et al. 2003). Diese werden zunächst in räumlicher Nähe zueinander positioniert, dann von eventuell überhängenden Nukleotiden befreit, und schließlich wieder miteinander ligiert (Lieber, Ma et al. 2003). Die essentiellen Moleküle dieser Prozesse sind die drei Untereinheiten Ku70, Ku80 und DNA-PKcs der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK) und der Komplex aus XRCC4 und der DNA-Ligase IV (Difilippantonio, Zhu et al. 2000). Im Gegensatz zu der NHEJ findet die HR-Reparatur hauptsächlich während der späten S- und G2-Phase statt (Couedel, Mills et al. 2004). Homologe Abschnitte auf dem Schwesterchromatid dienen als Matrize für die Neusynthese des gebrochenen DNA-Abschnitts (Bernstein, Bernstein et al. 2002). Dabei binden u. a. die Proteine BRCA1 und BRCA2 zusammen mit RAD50 und RAD51 die beiden DNA-Enden und katalysieren den Strangaustausch mit der intakten homologen DNA (Yang, Li et al. 2005). Eine HR-Reparatur an anderen homologen Abschnitten wie z. B. Allelen oder repetitiven Sequenzen kann zu dem Verlust der Heterozygotie bzw. zu chromosomalen Aberrationen führen (Moynahan and Jasin 1997; Richardson, Moynahan et al. 1998).

Die Gene beider Mechanismen werden *caretaker genes* genannt, da sie wichtige Schutzfunktionen für das Genom während der Embryonalentwicklung und zur Unterdrückung von Tumoren ausüben (Kinzler and Vogelstein 1997). Homozygote Defekte von Genen beider Reparaturmechanismen sind in Mausmodellen häufig embryonal letal, dies kann durch eine zusätzliche Mutation in p53 jedoch aufgehoben werden (*rescue mutation*). Dennoch sterben diese Tiere meist wenige Wochen nach der Geburt. Sie zeigen mit dem verstärkten Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen und Tumoren meist ähnliche Phänotypen. So führen Mutationen in den HR-Proteinen Rad50 (Mausmodell *Rad50<sup>ΔS</sup>*) und BRCA1 (Mausmodell *BRCA1<sup>Δ11/Δ11</sup>p53<sup>+/-</sup>*) zu Hypersensibilität gegen mutagene Substanzen und genomischer Instabilität (Lombard, Chua et al. 2005). In Zellen verschiedener *knock-out* Mausmodelle für das NHEJ-Gen *XRCC4* (*XRCC4<sup>+/-</sup>* bzw. *XRCC4<sup>-/-</sup>* mit *p53<sup>+/-</sup>* bzw. *p53<sup>-/-</sup>*) finden sich chromosomale Translokationen sowohl in Lymphomen als auch in genetisch instabilen Fibroblasten (Gao, Ferguson et al. 2000). Difilippantonio, Zhu et al. zeigten, dass das NHEJ-Protein Ku80 chromosomale Umordnungen und die maligne Transformation von Mauszellen verhindern kann. Ku80 defiziente Mäuse mit zusätzlichem Verlust von P53 (*Ku80<sup>-/-</sup>p53<sup>-/-</sup>*) sterben innerhalb von drei Monaten an disseminierten Pro-B-Zell-Lymphomen (Difilippantonio, Zhu et al. 2000).

Für Doppelstrangbrüche anfällige DNA-Abschnitte weisen häufig Besonderheiten in ihrer Sequenz oder Chromatinstruktur auf. So entsteht die Translokation t(14;18) in humanen Lymphomen wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer Abweichung von der üblichen helikalen DNA-Form im Gen *Bcl-2*. Die 150 bp große Hauptbruchpunktregion des Gens (*major breakpoint region*, Mbr) weist in 20 - 30% der humanen Allele statt der normalen B-DNA-Konformation abschnittsweise stabile

DNA-Einzelstränge auf. Es konnte gezeigt werden, dass der RAG Nuklease-Komplex in dieser Region unabhängig von spezifischen Rekombinationssignalen Doppelstrangbrüche katalysieren kann (Raghavan, Houston et al. 2004). Dies führte zu der Vermutung, dass Translokationen der Mbr in Abhängigkeit von einer anomalen Chromatinstruktur durch den RAG Nuklease-Komplex ausgelöst werden können. Ob eine veränderte DNA-Struktur ebenfalls mit der Anfälligkeit der *Common Fragile Sites* (CFS) für Doppelstrangbrüche zusammenhängt, ist nicht geklärt. CFS sind chromosomale Abschnitte, die in der späten S-Phase repliziert werden und häufig mit chromosomalen Aberrationen in Krebszellen assoziiert werden konnten (Debatisse, El Achkar et al. 2006). Beispielsweise unterbricht der für ein Ösophagus-Adenokarzinom beschriebene Translokationsbruchpunkt in der CFS FRA3B das mutmaßliche Tumorsuppressorgen *FHIT* und generiert dadurch möglicherweise einen selektiven Wachstumsvorteil für die Tumorzellen (Fang, Arlt et al. 2001). Zusätzlich scheinen Doppelstrangbrüche in CFS auch die intrachromosomale Amplifikation von Genen und damit die Aktivierung von Onkogenen auslösen zu können (Coquelle, Pipiras et al. 1997).

Regionen, in denen häufig Doppelstrangbrüche auftreten, konnten zum Teil mit bestimmten Sequenzmotiven assoziiert werden, von denen einige Replikationssignalen ähneln. Das Enzym Topoisomerase II katalysiert Doppelstrangbrüche zur Entflechtung zweier Doppelstränge während der Replikation (Giles and Sharma 2005). In Liposarkomen mit der Translokation t(12;16)(q32;q16) wurden in acht von neun Fällen Homologien zur Topoisomerase II-Erkennungssequenz in deletierten oder duplizierten Teilen des Fusionsgens *TLS(FUS)-CHOP* gefunden (Kanoë, Nakayama et al. 1999). Andere wiederholt auftretende Sequenzmotive an Translokationsbruchpunkten könnten im Zusammenhang mit dem Rekombinationsprozess stehen. So finden sich Varianten der Konsensus-Sequenzen ATGCAG und GCCC(A/T)(G/C)(G/C)(A/T) des Proteins Translin in besonders rekombinationsaktiven Genorten (Kasai, Matsuzaki et al. 1997). Homologien zu diesen konservierten Motiven wurden aber auch in der Nähe von Translokationsbruchpunkten in Liposarkomen entdeckt (Kasai, Matsuzaki et al. 1997; Kanoë, Nakayama et al. 1999). Da gezeigt werden konnte, dass Translinoligomere DNA-Enden nach einem Doppelstrangbruch ringförmig binden können, wird ihnen eine Rolle bei der Vermittlung von DNA-Reparatursignalen zugesprochen. Wie dieser Mechanismus in Verbindung zu einem möglichen Translokationsprozess stehen könnte, lässt sich jedoch bisher nur mutmaßen (Sengupta and Rao 2002).

Es gibt zahlreiche Hinweise für die Beteiligung repetitiver DNA-Sequenzen, insbesondere der *Alu*-Wiederholungssequenz, an Ereignissen der chromosomalen Umordnung (Portera, Venturin et al. 2006). Bruchpunkte auf Chromosom 22, die wiederholt in Tumoren dokumentiert wurden, liegen meist in *Alu*-Clustern, in denen die Dichte der *Alu*-Wiederholung wenigstens 20% beträgt (Kolomietz, Meyn et al. 2002). Der zugrunde liegende Mechanismus ist höchstwahrscheinlich eine durch die *Alu*-Sequenz fehlerhaft vermittelte homologe Rekombination zur Reparatur eines Doppelstrangbruchs. Dabei kann es zu Deletionen, Duplikationen oder Insertionen weniger Basenpaare direkt am Bruchpunkt kommen (Kanoë, Nakayama et al. 1999).

**Tabelle A** Von balancierten zytogenetischen Aberrationen betroffene Gene in Neoplasien (aus Mitelman; Johansson et al. 2004)

ABL1 <sup>a</sup> ◆●○▲▼■◇	CLTCL1 ◇	GRAF ◆	MALT1 ▼■	PAX7 <sup>b</sup> △	SSX4 <sup>b</sup> △
ABL2 <sup>a</sup> ◆●	CMKOR1 △	GSTP1 ○	MAML2 <sup>b</sup> □	PAX8 <sup>b</sup> □	STL ●
ACSL6 ◆	COL1A1 △	HAS2 △	MDS1 <sup>b</sup> ◆○▲	PBX1 <sup>b</sup> ◆●	SYK <sup>a</sup> ▲
AF1Q ◆	COL1A2 △	HEAB ◆	MDS2 ▲	PCM1 □	TAF15 <sup>b</sup> ◆●▲
AF5A ◆	COX6C △	HERVK ○	MECT1 □	PCSK7 ▼	TAL1 <sup>b</sup> ●□
AF5Q31 <sup>b</sup> ●	CREBBP <sup>b</sup> ◆●▲	HIP1 ▲	MKLT2A ▼	PDGFB ▼△	TAL2 <sup>b</sup> ●
AF15Q14 ◆●	CSF1 ◆	HIST1H4I ▼	MKL1 <sup>b</sup> ◆	PDGFRA <sup>a</sup> ○	TCEA1 <sup>b</sup> □
ALK <sup>a</sup> ◆▼◇△	CSF2 ◆	HLF <sup>b</sup> ●	MLF1 ◆	PDGFRB <sup>a</sup> ◆○▲	TCF3 <sup>b</sup> ◆●
ALPHA □	CSF3 ○	HLXB9 <sup>b</sup> ◆	MLL <sup>b</sup> ◆●○▲▼◇	PER1 ◆	TCF12 <sup>b</sup> △
ARHGEF12 ◆	CTNNB1 □	HMGA1 <sup>b</sup> △□	MLLT1 <sup>b</sup> ◆●	PICALM ◆●▼	TCL1A ◆◇
ARHH ▼■	CXXC6 ◆	HMGA2 <sup>b</sup> ▼△□	MLLT2 <sup>b</sup> ◆●	PIM1 ▼	TCL2 ●
ARNT ◆	DDIT3 <sup>b</sup> △	HOXA9 ◆○▲	MLLT3 <sup>b</sup> ◆●▲	PLAG1 <sup>b</sup> △□	TCL6 ●
ASPCR1 △□	DDX6 ●	HOXA11 <sup>b</sup> ○	MLLT4 ◆●	PML <sup>b</sup> ◆	TCTA ●
ATF1 <sup>b</sup> △	DDX10 ◆▲	HOXA13 ◆▲	MLLT6 <sup>b</sup> ◆	PNUTL1 ◆	TFE3 <sup>b</sup> △□
ATIC ◇△	DEK <sup>b</sup> ◆○▲	HOXC11 <sup>b</sup> ◆	MLLT7 <sup>b</sup> ◆●	POU2AF1 <sup>b</sup> ●	TFEB <sup>b</sup> □
ATM ◇	ELKS □	HOXC13 ◆	MLLT10 <sup>b</sup> ◆●▼	PPARG <sup>b</sup> □	TFG ◇□
BCL2 ●▼	ELL <sup>b</sup> ◆●▲	HOXD11 ◆	MN1 ◆○▲△	PRCC □	TFPT ●
BCL3 <sup>b</sup> ▼	EP300 <sup>b</sup> ◆	HOXD13 ◆	MSF ◆	PRDM16 <sup>b</sup> ◆▲	TIF1 <sup>b</sup> □
BCL6 <sup>b</sup> ●▼	EPS15 ◆	HPR □	MSI2 ○	PRKARIA □	TLX1 <sup>b</sup> ●◇
BCL7A ▼	ERG <sup>b</sup> ◆●△	HSRANAFV <sup>b</sup> △	MTCP1 ◇	PRRX1 <sup>b</sup> ◆	TLX3 <sup>b</sup> ●
BCL8 ▼	ERVWE1 ▼	IGH@ ●▼■◇	MUC1 ▼	PSIP1 <sup>b</sup> ◆	TNFRSF17 ◇
BCL9 ●▼	ETS1 <sup>b</sup> ▼	IGK@ ▼■	MYB <sup>b</sup> □	PVT1 ●▼	TOP1 ◆▲
BCL10 ▼	ETV1 <sup>b</sup> △	IGL@ ●▼■	MYC <sup>b</sup> ●▼■◇	RABEP1 ▲	TPM3 ◇□
BCL11A <sup>b</sup> ▼	ETV4 <sup>b</sup> △	IL2 ◇	MYH11 ◆○▲	RAD51L1 △	TPM4 ◇
BCL11B <sup>b</sup> ●	ETV6 ◆●○▲▼◇△□	IL21R ▼	MYST3 <sup>b</sup> ◆▲	RANBP2 △	TPR □
BCR ◆●○▲▼■◇	EVI1 <sup>b</sup> ◆○▲	IL3 ●	MYST4 <sup>b</sup> ◆▲	RANBP17 ●	TRA@ ●▼◇
BIRC3 ▼■	EWSR1 ●△□	IRF1 <sup>b</sup> ●	NCKPISD ◆	RAP1GDS1 ●	TRB@ ◆●◇
BRCA2 ▲	FCGR2B ▼	IRF4 <sup>b</sup> ■	NCOA2 ◆	RARA <sup>b</sup> ◆	TRD@ ●◇
BRD4 □	FGFR1 <sup>a</sup> ◆○	JAK2 <sup>a</sup> ●○	NCOA4 □	RBM15 ◆	TRG@ ●◇
BTG1 ▼	FGFR10P ◆○	JAZF1 <sup>b</sup> △	NFKB2 <sup>b</sup> ▼■◇	REL <sup>b</sup> ●▼	TRIM33 <sup>b</sup> □
BVR1 ▼	FGFR3 <sup>b</sup> ■◇	JJAZ1 <sup>b</sup> △	NONO □	RET <sup>a</sup> □	TRIP11 <sup>b</sup> ◆
C12orf9 △	FHIT □	KIAA1618 ◇	NOTCH1 <sup>b</sup> ●	RFG9 □	TTL ●
CARS △	FIP1L1 ○	KTN1 □	NPM1 ◆▼◇	ROS1 <sup>a</sup> △	WHSC1 <sup>b</sup> ■
CBFA2T1 <sup>b</sup> ◆○▲	FLI1 <sup>b</sup> △□	LAF4 <sup>b</sup> ●	NR4A3 <sup>b</sup> △	RPL22P1 ◆○	WT1 <sup>b</sup> △
CBFA2T3 <sup>b</sup> ◆▲	FN1 ◆	LAMA4 △	NRG1 □	RPN1 ◆▲	ZNF145 <sup>b</sup> ◆
CBFB <sup>b</sup> ◆○▲	FNBP1 ◆	LASP1 ◆	NSD1 <sup>b</sup> ◆	RPS10 □	ZNF198 <sup>b</sup> ○
CBL ◆	FOXO1A <sup>b</sup> △	LCK <sup>a</sup> ●	NTRK1 <sup>a</sup> □	RUNX1 <sup>b</sup> ◆●○▲	ZNF278 <sup>b</sup> △
CCDC6 ○□	FOXO3A <sup>b</sup> ◆	LCP1 ▼	NTRK3 <sup>a</sup> ◆△□	SEPT6 ◆	ZNF331 <sup>b</sup> □
CCND1 ▼■	FSTL3 ▼	LHFP △	NUMA1 ◆	SFPQ □	ZNF384 <sup>b</sup> ◆●
CCND2 ▼	FUS <sup>b</sup> ◆●△	LHX4 <sup>b</sup> ●	NUP98 ◆●○▲	SFRS3 ▼	ZNFN1A1 <sup>b</sup> ▼
CCND3 ▼■	FVT1 ▼	LIFR □	NUP214 ◆●○▲	SH3GL1 ◆	
CDK6 ▼	GAS7 <sup>b</sup> ◆	LMO1 <sup>b</sup> ●	NUT □	SIL ●	
CDKN2A ●▼	GMPS ◆	LMO2 <sup>b</sup> ●	ODZ4 □	SS18 <sup>b</sup> △	
CDX2 <sup>b</sup> ◆	GOLGA5 □	LPP ◆▲	OLIG2 <sup>b</sup> ●	SS18L1 <sup>b</sup> △	
CEP1 ○	GOPC △	LYL1 <sup>b</sup> ●	PAFAH1B2 ▼	SSH3BP1 ◆	
CHIC2 ◆	GPHN ◆	MAF <sup>b</sup> ■	PAX3 <sup>b</sup> △	SSX1 <sup>b</sup> △	
CLTC ◇△	GR6 ◆	MAFB <sup>b</sup> ■	PAX5 <sup>b</sup> ●▼	SSX2 <sup>b</sup> △	

◆ Akute Myeloische Leukämie; ● Akute Lymphatische Leukämie; ○ Chronisch Myeloproliferative Erkrankungen; ▲ Myelodysplastische Syndrome; ▼ maligne B-Zell Lymphome; ■ Plasmazeldyskrasien; ◇ maligne T-Zell Lymphome; △ Mesenchymale Tumore; □ Epitheliale Tumore (<sup>a</sup>Gene für Tyrosinkinasen; <sup>b</sup>Gene für Transkriptionsfaktoren)

Dass die räumliche Nähe von zwei Genorten im Interphasekern ebenfalls Translokationen begünstigen kann, zeigten Roix, McQueen et al. in einer Untersuchung über die relative Nähe von *MYC* und seinen Fusionspartnern in karyotypisch normalen B-Zellen. Der häufig nachgewiesene Fusionspartner *IGH* lokalisiert signifikant näher zu *MYC* als seine weniger häufigen Partner *IGL* und *IGK*, die Loci für die leichten Ketten  $\lambda$  und  $\kappa$  der Immunglobuline. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die räumliche Nähe nicht locus-spezifisch, sondern abhängig von der Anordnung des Genoms im Interphasekern ist. Eine charakteristische Umordnung während der Gewebedifferenzierung könnte das Auftreten stadienspezifischer Translokationen in B-Zellen erklären (Roix, McQueen et al. 2003).

Mit der *Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer* steht eine wichtige Datenbank über das Vorkommen von strukturellen Chromosomenaberrationen zur Verfügung (<http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>). Tabelle A gibt einen Überblick über die Gene, die von balancierten Aberrationen in Neoplasien betroffen sind (Mitelman, Johansson et al. 2004).

## 1.4 Techniken zur Analyse von Chromosomenaberrationen

Seit der Einführung der chromosomalen Bänderungstechnik 1970 von Caspersson et al. spielt die zytogenetische Analyse für die Diagnostik von chromosomalen Veränderungen bei Krebserkrankungen eine wichtige Rolle (Caspersson, Zech et al. 1970). Mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) – der Hybridisierung fluoreszenzmarkierter Sonden auf Metaphasechromosomen – wurde die Identifizierung von Aberrationen möglich, die mittels Bänderungstechnik nicht detektierbar waren. So konnte die telomerische Translokation  $t(12;21)(p13;q22)$  mit chromosomenspezifischen Sonden (*whole chromosome painting*) nachgewiesen und mit der Akuten Lymphatischen B-Zell Leukämie assoziiert werden (Lengauer, Riethman et al. 1992; Romana, Le Coniat et al. 1994). Leukämiepatienten profitieren während der Dokumentation einer Therapieantwort von dem Nachweis spezifischer Translokationen mittels Interphase-FISH, da sie auf ruhende Zellen angewandt wird und mit einer Immunphänotypisierung kombiniert werden kann (Billstrom, Johansson et al. 1997). 1996 wurden erstmals zwei Techniken des *whole chromosome painting* aller Chromosomen in einer Metaphase vorgestellt: SKY (*spectral karyotyping*) und M-FISH (*multiplex-FISH*) (Schrock, du Manoir et al. 1996; Speicher, Gwyn Ballard et al. 1996). Anhand solcher Analysen lässt sich die Komplexität der genomischen Veränderungen in soliden Tumoren anschaulich darstellen. So fanden Wong, Lai et al. mittels SKY 21 neue Bruchpunktregionen in Hepatozellulären Karzinomzellen (HCC) (Wong, Lai et al. 2000). Die genannten Techniken werden unter anderem durch die Schwierigkeit limitiert, ausreichend Metaphasen in guter Qualität aus epithelialen Tumorzellen für die Analyse zu gewinnen.

Die komparative genomische Hybridisierung (CGH) nutzt den Vergleich von Signalintensitäten unterschiedlich fluoreszenzmarkierter normaler und Tumor-DNA, die auf normale Metaphasen hybridisiert wurde (Kallioniemi, Kallioniemi et al. 1992; du Manoir, Speicher et al. 1993). Ein

Ungleichgewicht zwischen beiden Hybridisierungssignalen gibt Auskunft über Gewinne und Verluste genetischen Materials in Tumorzellen. Die CGH hat zur Identifizierung von typischen Mustern (Profilen) nicht balancierter Aberrationen in verschiedenen epithelialen Tumoren, verschiedenen Stadien innerhalb eines Tumortyps und einzelnen disseminierten Tumorzellen geführt (Ried, Heselmeyer-Haddad et al. 1999; Rooney, Murray et al. 1999; Schmidt-Kittler, Ragg et al. 2003). Ein wichtiger Beitrag der CGH zur Analyse von Tumorzellen liegt im Aufzeigen von amplifizierten Regionen, die möglicherweise Onkogene enthalten (Forozan, Karhu et al. 1997) ebenso wie von deletierten Regionen, die potentielle Tumorsuppressorgene enthalten (Dellas, Torhorst et al. 1999). Die Nachweisgrenze von genomischen Verlusten oder Gewinnen liegt bei einer CGH auf Mikroarrays heute bei ca. 0,8 Mb (Snijders, Pinkel et al. 2003; Krzywinski, Bosdet et al. 2004).

Die Kombination der beschriebenen zytogenetischen Methoden kann das Verständnis der komplexen Veränderungen in epithelialen Tumorzellen verbessern, wie z. B. anhand des Nierenzellkarzinoms bei Von-Hippel-Lindau Patienten gezeigt werden konnte (Phillips, Ghadimi et al. 2001). Regionen, die Translokationsbruchpunkte enthalten, können auf diese Art und Weise jedoch nur grob eingegrenzt werden. Zur genauen Charakterisierung der betroffenen Gene in der optisch identifizierten Kandidatenregion sind weitere Experimente erforderlich. Durch eine positionelle Klonierung konnten im Jahr 2003 die Gene *LSAMP* und *NORE1* identifiziert werden, die in Nierenzellkarzinomen häufig von der Translokation  $t(1;3)(q32,1;q13.3)$  betroffen sind und jeweils eine potentielle Tumorsuppressorfunktion ausüben (Chen, Lui et al. 2003). Hierbei konnten Kandidatenregionen auf beiden Chromosomen mittels FISH-Experimenten auf 20 bis 30 kb große Bereiche begrenzt, und diese durch *Southern Blot* Analysen und Restriktionskartierungen auf ca. 2 kb verringert werden. Daraufhin wurden mehrere spezifische Primerpaare für diese Sequenzen ausgewählt (Datenbank des Humanen Genomprojekts) und eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für 10 – 20 kb große DNA-Fragmente (*long-range* PCR) durchgeführt, um Fragmente mit den gesuchten Bruchpunkten zu amplifizieren. Ein solches Vorgehen ist allerdings trotz gut etablierter Techniken und der Zugänglichkeit von digitalen Sequenzdaten arbeitsaufwendig und langwierig.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

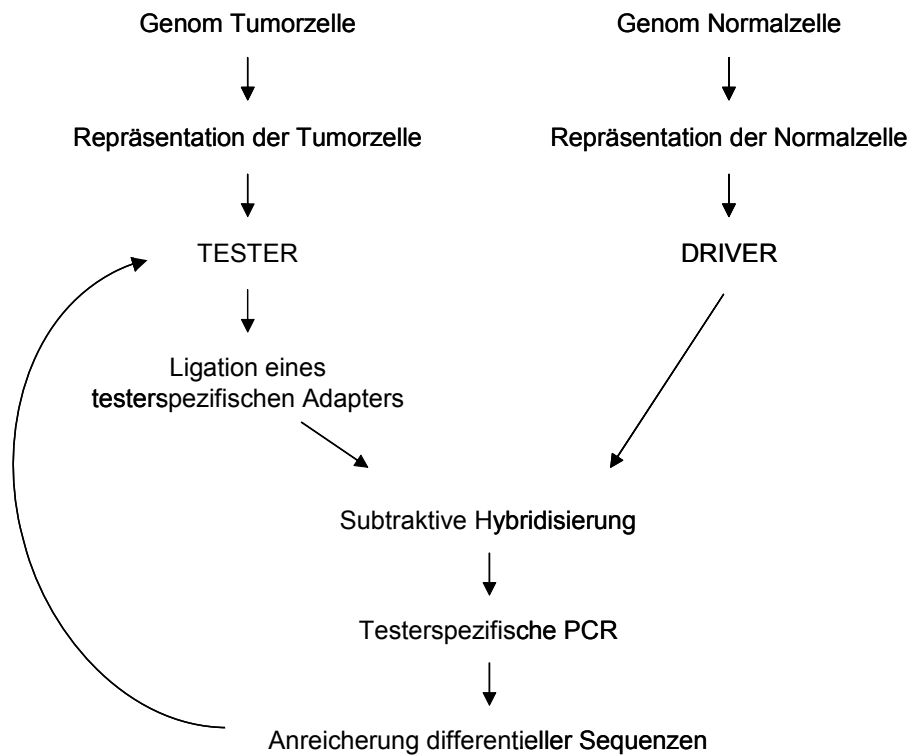
Bei epithelialen Tumoren handelt es sich bei den strukturellen Aberrationen, die mit tumorigenen Eigenschaften der betroffenen Gene assoziiert werden konnten, bis dato fast ausschließlich um unbalancierte Ereignisse wie Deletionen von Tumorsuppressorgenen (Niketeghad, Decker et al. 2001; Nakayama, Nakayama et al. 2006) oder Amplifikationen von Onkogenen (Slamon, Godolphin et al. 1989). Dies ließe einerseits den Schluss zu, dass Karzinome meist durch translokationsunabhängige Mechanismen entstehen, andererseits, dass ihre Translokationen subzytogenetische Ereignisse sind, die in komplex veränderten Karyotypen schwer zu entdecken sind (Kroll, Sarraf et al. 2000). Die schnelle und direkte Detektion von unbekannten Translokationsbruchpunkten in komplexen



Karyotypen ist derzeit nicht möglich. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Entwicklung einer hochauflösenden Methode zur Identifizierung von Bruchpunkten aus chromosomalen Aberrationen.

Der hier verwendete methodische Ansatz basiert auf der 1993 von Lisitsyn et al. entwickelten Repräsentations-Differenzanalyse (*Representational Difference Analysis*, RDA, (Lisitsyn, Lisitsyn et al. 1993)). Es handelt sich dabei um eine Methode, die durch eine Kombination aus PCR- und subtraktiver Hybridisierungs-Technik Unterschiede zwischen zwei ähnlichen genomischen Sequenzpools aufdecken kann. Später wurde die RDA für die Analyse differentiell exprimierter Gene modifiziert (Hubank and Schatz 1994). Die RDA zweier cDNA-Pools wurde mehrfach weiterentwickelt und wird bis heute zur Analyse differentieller Transkriptome genutzt (Pastorian, Hawel et al. 2000; Bowler 2004).

Die Limitationen der klassischen subtraktiven Hybridisierungs-Technik (Subtraktion) für die Anwendung auf komplexe Genome konnten von Lisitsyn et al. durch die Verwendung so genannter Repräsentationen und das Phänomen der kinetischen Anreicherung (engl: *kinetic enrichment*) überwunden werden. Durch die Subtraktion von zwei humanen Genomen konnten bis dato nur sehr große Sequenzunterschiede zwischen dem zu untersuchenden Sequenzpool (Tester) und einem Referenzpool (Driver) gefunden werden, da die hohe genomische Komplexität (d. h. die Gesamtlänge an einmalig vorkommenden Sequenzen) zu groß für eine subtraktive Hybridisierung von Tester und Driver war. Durch die Bildung von Repräsentationen, repräsentativen Anteilen von Tester und Driver, konnten Lisitsyn et al. die Komplexität humaner Genome auf ein für eine effektive Hybridisierung notwendiges Maß von ca. 10 - 20% reduzieren. Eine weitere Neuerung, die von Lisitsyn et al. eingeführt wurde, ist die Anreicherung von differentiellen Fragmenten nach der subtraktiven Hybridisierung über testerspezifische Adaptersequenzen. Eine n-fache Anreicherung führt dazu, dass differentielle Fragmente bei der Wiederholung der subtraktiven Hybridisierung im Vergleich zu nicht amplifizierten Sequenzen des Testers nach der Formel  $n^2$  häufiger rehybridisieren, was als kinetische Anreicherung bezeichnet wird. Durch mehrfache Hybridisierungszyklen ermöglicht die RDA nach Lisitsyn eine Anreicherung von differentiellen Sequenzen in einer Größenordnung von bis zu sieben Zehnerpotenzen.



**Abb. 1** Repräsentations-Differenzanalyse (RDA) nach Lisitsyn zur Anreicherung tumorspezifischer (differentieller) Sequenzen. Tumorspezifische Verluste können durch die Verwendung des Normalgenoms als Tester und des Tumorgenoms als Driver angereichert werden.

Diese Arbeit stellt eine Erweiterung der RDA nach Lisitsyn, Lisitsyn et al. (Abb. 1) dar. Ein neuartiges Verfahren zur Reduktion der genomischen Sequenzkomplexität soll die genomweite Detektion von chromosomalen Bruchpunkten in Tumorzellen ermöglichen. Die Methode könnte einen Beitrag für ein besseres Verständnis der Krebsentstehung und dem Zusammenhang von Klonalität in der systemischen Krebserkrankung leisten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Produkt	Bestell Nr.	Firma
Acrylamid/BIS 30%	1610156	BioRad, München
Agar bacteriological	07-004	Scharlau Chemie
Agarose, for routine use	A9539-5009	Sigma-Aldrich
Ammoniumacetat	1116.100	Merck KgaA
Ammoniumpersulfat	171311-01	Amersham Biosciences
Ampicillin Na-Salt Cryst.	01503	Biomol GmbH
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragment	1093274	Roche
Aqua-Roti-Phenol	A980.1	Carl Roth GmbH+Co
Bind-Silane, PlusONe	17-31330-01	Amersham Biosciences
Blocking Reagent	1096176	Roche
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	0055	J. T. Baker
Bovine Serum Albumin (BSA) 20 mg/ml	711454	Roche
Bromphenolblau	18030	Fluka (Biochemika)
B+ Puffer	BB5	MBI Fermentas
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	C3881	Sigma-Aldrich
Chloroform	C-2432	Sigma-Aldrich
CSPD <sup>®</sup> Disodium 3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxethane-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ] Decan}-4-yl) Phenylphosphat	1655884	Roche
dATP, dTTP, dCTP, dGTP (Sequencing Grade)	27-2035-01	Amersham Biosciences
Dig-11-dUTP (Digoxigenin-11-2'Uridin-5'-Triphosphat, Alkali-labil)	1573152	Roche
Dichlordimethylsilan (2% in 1,1,1-Trichlorethan)	103014	Merck KgaA
DNA Molecular Weight Marker X	1498037	Roche
EPPS	E9502	Sigma-Aldrich
Essigsäure 96%	100058	Merck KgaA
Ethanol 99,9 %	8006	J. T. Baker
Ethidumbromid	46067	Fluka BioChemika
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	ED2SS	Sigma-Aldrich
Fetal Calf Serum (FCS)	A15-649	PAA Laboratories GmbH
Ficoll-400	F-4375	Sigma-Aldrich
Formamid, deionisiert	F-9037	Sigma-Aldrich
Glycerol	97893	Sigma-Aldrich
Harnstoff (H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> )	8487	Merck KgaA
Hefe tRNA	109541	Roche
Hefeextrakt (Select Yeast Extract)	30393-029	Gibco BRL
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)	H-3375	Sigma-Aldrich
Hering Sperm DNA (10 mg/ml)	15634.017	Gibco BRL
Human Cot-1 DNA <sup>®</sup> (1mg/ml)	15279-011	Invitrogen
Igepal CA-630	I-3021	Sigma-Aldrich
Isopropanol	6752.2	Carl Roth GmbH+Co
Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG)	05684	Biomol GmbH
Kaliumacetat (CH <sub>3</sub> COOK)	104820	Merck KgaA
Kaliumchlorid (KCl)	104936	Merck KgaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	104873	Merck KgaA
Ligase Puffer (10x)	1243292	Roche
Maleinsäure	M-0375	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	A537.1	Carl Roth GmbH+Co
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	59270100	Merck KgaA

MOPS p. A. 3-(N-Morpholino)propane-sulfonic acid	06170	Biomol GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	0278	J. T. Baker
Natriumcitrat ( <i>tri</i> -Natriumcitrat-Dihydrat)	A2403	AppliChem GmbH
Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Monohydrat	106346	Merck KGaA
Natriumhydroxid (NaOH)	6771.1	Carl Roth GmbH+Co
Ninodet P40 (NP40)	N-0896	Sigma-Aldrich
O+ Puffer	BO5	MBI Fermentas
OPHA-Puffer (One-Phor-All Buffer plus)	270901-02	Amersham Biosciences
PCR-H <sub>2</sub> O (LiChrosolv für Chromatographie, RNase frei)	115333	Merck KGaA
PCR-Öl	M-5904	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100x)	P11-010	PAA Laboratories
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	A156.2	Carl Roth GmbH+Co
Pepton (Select Pepton 140)	30392-021	Gibco BRL
PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent	P-7581	Molecular Probes
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium)	31870-025	Gibco BRL
Repel-Silane (Dimethyldichlorsilan 2% w/v in Oktamethylcyclotetrasiloxan)	17-1332-01	Amersham Biosciences
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	20760	Serva
Sybr-Gold	S-11494	Molecular Probes
TEMED	171312-01	Amersham Biosciences
TE-Puffer 1x - pH 8,0	A0386	AppliChem GmbH
Tris pure (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	50005	Biomol GmbH
Trypton/Pepton aus Casein	8952.2	Carl Roth GmbH+Co
TWEEN® 20	P-9416	Sigma-Aldrich
X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)	0651745	Roche
Xylencyanol	110590	Merck KGaA

## 2.1.2 Enzyme

Produkt	Bestell Nr.	Firma
Bsp TI (10 U/μl)	ER0832	Fermentas GmbH
DNA Polymerase Mix (5 U/μl) aus Expand Long Template PCR System	1759060	Roche
Dra I (10 U/μl)	ER0222	Fermentas GmbH
Ksp AI (10 U/μl)	ER1032	Fermentas GmbH
Mse I (50 U/μl)	R0525M	New England Biolabs
Mung-Bean Nuclease I (10 U/μl) mit Puffer	M0250S	New England Biolabs
Panscript Polymerase (5 U/μl)	BT-10EE	PAN Biotech GmbH
Proteinase K	3115801	Roche
T4 DNA Ligase	0716359	Roche
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	1435094	Roche
Vsp I (10 U/μl)	ER0912	Fermentas GmbH

## 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bestell Nr.	Firma
Anti-Digoxigenin Magnetische Partikel	1641751	Roche
Blottingpapier	GB004	Whatman
DIG Easy Hyb Granules	1796895	Roche
Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids	1363514	Roche
Dynabeads® M-280 Streptavidin (6-7x 10 <sup>8</sup> beads/ml)	112.06	Dynal
Expand Long Template PCR System	1759060	Roche
Filtrierungseinheit (0,2 μm)	FP30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
High Pure PCR Product Purification Kit	1732668	Roche
Hybridisierungsröhrchen	-	Biometra

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	3003230	Roche
LightCycler Capillaries 20 µl	11909339001	Roche
Magnetständer (DynaL MPC-9600)	120.06	DynaL
Microcon YM-30 Filtereinheit	42410	Amicon
Microplatte, 96 Well, PP, schwarz, F-Boden	655209	Greiner Bio-One
Nucleospin Extract 2	2740609.10	Macherey-Nagel
Nylonmembran	1209299	Roche
Petrischale (90 mm)	663102	Greiner Bio-One
pGEM®-T Easy Vector System I	A1360	Promega
Pipetten (P2, P20, P200, P1000)	-	Gilson
QIAprep Miniprep Kit	27106	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	28706	Qiagen
Quick Ligation™ Kit	M2200L	New England Biolabs
PET-Folie	129 2126	VWR International
Reaktionsgefäß 0,2 ml (Thermo-Tubes)	AB-0337	Abgene
Reaktionsgefäß 1,5 ml (Microtubes)	780500	Brand
Röhrchen 15 und 50 ml	227261/227270	Greiner Bio-One
Röntgenbedarf	-	D. Linhardt, München
Röntgenfilme (Biomax Light Film)	153 8966	Kodak
Streptavidin Magnetische Partikel	1641786	Roche
Wizard® SV PCR Clean-Up System	A9280	Promega

## 2.1.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Firma
Blockthermostat	BT1301	HLC
Brutschrank für Bakterien	2737	Köttermann
Brutschrank für Zellkultur BB 6220	51007413	Heraeus Instruments
Elektrophorese Geräte	Horizon 11.14	Gibco
Entwicklermaschine 35compact	-	Protec
Hybridisierungsöfen Shake "n" Stack	HBSNSRS220	Thermo Electron Corp.
LightCycler Instrument	-	Roche Applied Science
PAA-Gel Spannungsquelle	2297 Macrodrive S	LKB Bromma
PAA-Gelkammer	Separation System	Owl
Roller SRT1	SRT1	Stuart Scientific
Schüttelinkubator	"Celloshaker Variospeed"	Chemotron
Spektrofluorimeter	GENios pro	Tecan
Sterilbank LaminAir	HLB 2472	Heraeus
Stratalinker® 2400 UV Crosslinker	400076	Stratagene
Thermocycler "LightCycler"	-	Roche
Thermocycler "MJ Research PTC 200"	PTC-0200 + ALD-1244	MJ Research
Thermocycler "Robocycler® 96 Gradient"	400886	Stratagene
Tischzentrifuge 5402	5402	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417C	5417C	Eppendorf
UV-Transilluminator, 312 nm	-	INTAS
Zentrifuge Hettich	Rotix/RP	Hettich

## 2.1.5 Puffer, Lösungen und Medien

Puffer, Lösung oder Medium	Zusammensetzung
APS 10%	1g Ammoniumpersulfat ad 10 ml PCR-H <sub>2</sub> O
Bindepuffer (BP) 2x für Dynal Streptavidin-Partikel	2 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA (pH 8,0)
Bindepuffer (BP) 1x für Dynal Streptavidin-Partikel	1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)
Waschpuffer für Dynal Streptavidin-Partikel	1 x Bindepuffer mit 1/40 (v/v) NP40
bind-silane-Lösung	50 µl Ethanol 100%, 188 µl Bind-Silane, 10% Essigsäure
Blocklösung (2.7.2)	5 ml Blocking Reagent, 45 ml Puffer 1 (für Filter)
Denaturierungspuffer	0,5 M NaOH, 3 M NaCl
EE-Puffer 3x	30 mM EPPS (pH 8), 3 mM EDTA in PCR-H <sub>2</sub> O
Ladepuffer für Agarosegel	25 % Ficoll-400, 0,4 % Bromphenolblau in 1x TBE
HEPES-Puffer	140 mM NaCl, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 50 mM HEPES. Steril filtrieren.
K562-Medium	10% FCS in RPMI 1640, 200 µg/ml Penicillin/Streptomycin
Laufpuffer	5 ml Formamid, 250 µl Laufpuffer-Stammlsg., 250 ml 200 mM EDTA
Laufpuffer-Stammlsg. 1%	10 mg Bromphenolblau, 10 mg Xylencyanol in 1 ml H <sub>2</sub> O
LB Medium	50 g Select Pepton, 25 g Hefeextrakt, 50 g NaCl mit 5 l H <sub>2</sub> O (pH 7)
LB Platte / Ampicillin	500 ml LB Medium mit 6 g Agar autoklavieren, auf 60°C abkühlen, Ampicillin ad 100 µg/ml zugeben. Wenn gewünscht, zusätzlich
LB Platte / Ampicillin / X-Gal/IPTG	0,5 mM IPTG und 800 µl X-Gal-Lösung zugeben (Endkonzentration 80 µg/ml), in Petrischalen gießen.
Lösung A (PK-Verdau)	100 mM KCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl <sub>2</sub>
Lösung B (PK-Verdau)	10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 2,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1% Tween-20, 1% Igepal
Neutralisierungspuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 7,5), 3 M NaCl
PAA-Gel Stammlösung	116,5 ml 30% Acrylamid/BIS + 160 ml Formamid + 168 g Harnstoff + 50 ml 10x TBE, ad 500 ml, steril filtrieren
PBS 1x	8,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 150 mM NaCl, pH 7,4
PCR-Puffer mit dNTPs 10x	500 mM KCl, 100 mM Tris HCl (pH 8,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , je 1 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP
PicoGreen-TE Lösung	PicoGreen® dsDNA Quantitation Reagent im Verhältnis 1:1000 in 1x TE (pH 7,4)
Puffer 1 (für Filter)	4,64 g Maleinsäure und 3,50 g NaCl in 400 ml H <sub>2</sub> O lösen, pH 7,5
Puffer 1-Tween-Lösung	1,5 ml TWEEN-20 in 500 ml Puffer 1 (für Filter)
Puffer 3	100 mM Tris (pH 9,5), 100 mM NaCl
SDS 10 %	100 g SDS in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,2
SSC 20x	175,3 g NaCl, 88,2 g Natriumcitrat in 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,0
TBE 10x (Tris-Borat-EDTA)	539 g Tris, 275 g Borsäure, 37 g EDTA, ad 5 l cum H <sub>2</sub> O, pH 8,3
TEN100 Bindepuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,5), 100 mM NaCl
TEN1000 Waschpuffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA (pH 7,5), 1 mM NaCl
TFB I	30 mM Kaliumacetat, 50 mM MnCl <sub>2</sub> , 100 mM KCl, 10 mM CaCl <sub>2</sub> , Glycerol 15% (w/v), steril filtrieren
TFB II	10 mM Na-MOPS, 50 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM KCl, Glycerol 15% (w/v), steril filtrieren
Tris-Lösung	50 mM Tris/HCL (pH 8,9), steril filtriert (Porengröße 0,45 µm)
WP1 Waschpuffer	0,1% SDS in HEPES-Puffer
WP2 Waschpuffer	0,05% Igepal in HEPES-Puffer
WP <sub>1</sub> 50 Waschpuffer	50% Formamid (deionisiert) in WP1
WP <sub>2</sub> 50 Waschpuffer	50% Formamid (deionisiert) in WP2
X-Gal-Lösung 50 mg/ml	100 mg X-Gal in 2 ml Dimethyl-Formamid

## 2.2 Endonuklease-Reaktionen

Enzymatische Reaktionen wurden, wenn nicht anders angegeben, in Reaktionsgefäßen von 0,2 µl (Thermo-Tubes, Abgene) Fassungsvermögen in einem Thermocycler (MJ-Research PTC 200) durchgeführt.

### 2.2.1 Mse I-Verdau

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mse I-Reaktion zum initialen Restriktionsenzymverdau genomischer DNA (siehe 2.8) und zum Abtrennen von Adaptersequenzen angewendet. Ein Mse I-Reaktionsansatz enthielt neben 10% OPHA-Puffer zwischen 10 und 25 Einheiten (U) Enzym (New England Biolabs) pro µg DNA, wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und abschließend für 5 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.2.2 Fraktionierungsverdau mit Dra I, Ksp AI, Vsp I und Bsp TI

Der Restriktionsverdau von DNA mit den Enzymen Dra I, Ksp AI, Vsp I bzw. Bsp TI (alle Fermentas GmbH) zur Vorbereitung für die Fraktionierung mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotid-Adaptoren wurde mit 10 U Enzym pro µg DNA und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer (Vsp I und Bsp TI: O+, Ksp AI: B+, Dra I: Y-Tango) für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Die Enzyme wurden abschließend für 20 min bei 65°C inaktiviert.

### 2.2.3 MBN-Verdau

Die *Mung Bean Nuclease* (MBN) ist eine Einzelstrang-spezifische DNA- und RNA-Endonuklease. Da sie sowohl einzelsträngige 5'- als auch 3'-Überhänge abbaut, wird sie vor allem für die Vorbereitung von überhängenden DNA-Enden zur *blunt-end* Ligation verwendet. In dieser Arbeit wurde das Enzym benutzt, um einzelsträngige DNA-Fragmente aus PCR-Produkten zu entfernen. Die PCR-Produkte wurden zunächst mit Hilfe einer DNA-Säule (*Wizard® SV PCR Clean-Up System*, Promega) aufgereinigt und in 40 µl PCR-H<sub>2</sub>O eluiert. Anschließend wurden 34 µl der Probe mit 20 U MBN und 10% MBN-Puffer (beide New England Biolabs) in einem Volumen von 40 µl für 60 min bei 30°C inkubiert. Um die DNA vor Degradation zu schützen, wurden vor der Inaktivierung des Enzyms für 5 min bei 98°C 160 µl Tris-HCL (50 mM, pH 8,9) zum Reaktionsansatz gegeben.

## 2.3 Oligonukleotid-Adapter

### 2.3.1 Annealing-Reaktion

In der Annealing-Reaktion wurden ein langes (21 - 57 bp) und ein kurzes (11 - 15 bp) komplementäres Oligonukleotid miteinander hybridisiert, so dass ein doppelsträngiger Oligonukleotid-Adapter (kurz: Adapter) entstand. Hierzu wurde der Reaktionsansatz in einem Thermocycler in Schritten von -1°C/min von 65°C auf 15°C abgekühlt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion

(Metabion International GmbH, Martinsried) synthetisiert. Bei einer Positivselektion mittels markierter Adapter (2.10) wurden lange Oligonukleotide verwendet, die jeweils am 5'-Ende ein Biotin- bzw. Digoxigeninmolekül gebunden hatten. Durch ein Dideoxycytidin (ddC) an den 3'-Enden der kurzen Oligonukleotide wurde verhindert, dass sie im Verlauf einer PCR durch eine Polymerase verlängert werden konnten.

Es wurden Adapter in den Konzentrationen 50  $\mu\text{M}$  und 16  $\mu\text{M}$  verwendet. Für einen Reaktionsansatz von 50  $\mu\text{M}$  Adapter wurden die Stocklösungen (100  $\mu\text{M}$ ) beider Oligonukleotide im Verhältnis 1:2 gemischt. Für einen Reaktionsansatz von 16  $\mu\text{M}$  Ansatz wurden beide Stocklösungen im Verhältnis 1:1:1:3 mit OPHA-Puffer und PCR- $\text{H}_2\text{O}$  gemischt. Die fertigen Adapter wurden entweder direkt in eine Ligation (s. u.) eingesetzt oder bei  $-20^\circ\text{C}$  in Aliquots gelagert.

### 2.3.2 Ligationsverfahren

Die T4-DNA Ligase verknüpft in Anwesenheit von ATP doppelsträngige DNA-Moleküle miteinander, indem sie die kovalente Bindung eines 5'-Phosphatrests mit einer 3'-OH-Gruppe katalysiert („Ligation“). In dieser Arbeit wurden DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA Ligase mit doppelsträngigen Oligonukleotid-Adaptoren verbunden, die in nachfolgenden PCR als Primerbindestelle dienten. In den im Folgenden beschriebenen Ligationen wurden die langen Oligonukleotide von Adaptoren kovalent an DNA-Fragmente gebunden. Die kurzen Oligonukleotide wurden dabei nicht kovalent gebunden, da sie keine Phosphatreste an ihren 5'-Enden aufwiesen. Sie blieben über die komplementäre Basenpaarung bis zu Temperaturen von ca. 34 -  $40^\circ\text{C}$  gebunden.

#### 2.3.2.1 Standardligation

Die im Folgenden als „Standardligation“ bezeichnete Reaktion wurde bei  $15^\circ\text{C}$  für mindestens 5 h, in der Regel jedoch über Nacht mit Hilfe einer T4-DNA Ligase (Roche) in einem Thermocycler durchgeführt. DNA-Mengen bis zu ca. 2  $\mu\text{g}$  wurde in einem Volumen von 20  $\mu\text{l}$  ligiert (Tab. 1A). Bei DNA-Mengen bis zu 6  $\mu\text{g}$  betrug das Reaktionsvolumen 100  $\mu\text{l}$  (Tab. 1B).

**Tab. 1** Standardligation

(A)		(B)	
OPHA Puffer	2 $\mu\text{l}$	OPHA Puffer	10 $\mu\text{l}$
ATP (10 mM)	2 $\mu\text{l}$	ATP (10 mM)	10 $\mu\text{l}$
T4-DNA Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	2 $\mu\text{l}$	T4-DNA Ligase (5 U/ $\mu\text{l}$ )	10 $\mu\text{l}$
Adapter (16 $\mu\text{M}$ )	2 $\mu\text{l}$	Adapter (50 $\mu\text{M}$ )	40 $\mu\text{l}$
Probe	0,5 – 2 $\mu\text{g}$	Probe	6 $\mu\text{g}$
$\text{H}_2\text{O}$	ad 20 $\mu\text{l}$	$\text{H}_2\text{O}$	ad 100 $\mu\text{l}$



### 2.3.2.2 Quick Ligation

Mit dem *Quick Ligation Kit* (New England Biolabs), der zur Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmid-Vektoren entwickelt wurde, kann eine Ligation in kurzer Zeit durchgeführt werden. Das Protokoll des Herstellers sieht eine fünfminütige Reaktion bei RT vor (Tab. 2C). Da die Ligation von PCR-Adapttern an DNA-Fragmente üblicherweise mehrere Stunden dauert, wurde der *Quick Ligation Kit* verwendet, um diese Reaktion schneller durchführen zu können („Quick Ligation“).

Für eine Quick Ligation wurden Oligonukleotid-Adapter zum einen in Lösung in den Reaktionsansatz gegeben (Tab. 2A) und dieser für 1 h bei RT in einem Reaktionsgefäßes (0,2 ml) inkubiert. Zum anderen wurden sie zuerst an paramagnetische Partikel gekoppelt (2.10.1) und diese dann mit dem Reaktionsansatz gemischt und inkubiert (Tab. 2B). Während der Reaktion (1 h, RT) wurde eine Sedimentation der Partikel durch ständige Bewegung des Reaktionsgefäßes auf einem Roller SRT1 (Stuart Scientific) verhindert.

**Tab. 2** Quick Ligation

(A) Adapter in Lösung		(B) Adapter an Partikeln		(C) Herstellerangaben	
2x Puffer	10 µl	2x Puffer	20 µl	2x Puffer	10 µl
Ligase (50 U/µl)	1 µl	Ligase (50 U/µl)	2 µl	Ligase (50 U/µl)	1 µl
Adapter (50 µM)	2 µl	—	—	Plasmidvektor	1 µl
Probe	800 ng	Probe	600 ng	Probe	8 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl	Partikel in H <sub>2</sub> O	ad 40 µl		

### 2.3.3 Auffüllen von Oligonukleotid-Adapttern

Um an DNA-Fragmenten Bindestellen für PCR-Primer zu synthetisieren, wurden die überhängenden 5'-Enden von ligierten Adapttern durch eine Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt. Die so genannte Auffüllreaktion erfolgte bei 68°C; bei dieser Temperatur war das kurze Oligonukleotid eines Adapters bereits dissoziiert, so dass die Polymerase den komplementären Strang zum langen Oligonukleotid synthetisieren konnte. Der neu synthetisierte Gegenstrang zum langen Oligonukleotid diente im Folgenden als Primerbindestelle.

#### 2.3.3.1 Standard-Auffüllreaktion

Bei der Standard-Auffüllreaktion wurden Ligationsprodukte unmittelbar vor einer PCR für 3 – 5 min bei 68°C inkubiert. Der jeweilige PCR-Reaktionsansatz (z. B. 2.4.2.2.1, 2.4.3.2) diente dabei als Auffüllreaktionsansatz. Es wurden Ligationsprodukte aus Standard- oder Quick Ligationen als Template verwendet. Da die Volumina der Ligationsprodukte variierten, wurden die Ansätze der Reaktion so angepasst, dass das Template zwischen 5 - 10% des Gesamtvolumens ausmachte.

#### 2.3.3.2 Auffüllreaktion an paramagnetischen Partikeln

Bei der Positivselektion von DNA-Fragmenten an paramagnetischen Partikeln (2.10.1) wurde die Auffüllreaktion in einem eigenständigen Reaktionsansatz durchgeführt, der mit den Partikeln gemischt

und nach der Reaktion wieder von ihnen abgenommen wurde. Die Reaktion erfolgte für 3 – 5 min bei 68°C in einem Thermocycler.

Es wurden Ligationen aus Quick Ligationen als Template verwendet, die an paramagnetische Partikel gekoppelt waren. Diese wurden vor der Auffüllreaktion einmal mit 100 µl Waschpuffer 2 (WP2, 2.1.5) gemischt und an einen Magneten gestellt. Daraufhin wurde der Überstand abgenommen, die Partikel im Auffüllreaktionsansatz resuspendiert und die Reaktion durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 10% PCR-Puffer P1, 5 U Polymerase-Mix (beides *Expand Long Template PCR System*, Roche), 4 mM dNTPs (Amersham Biosciences) und 1,25 µl BSA (Roche) in einem Gesamtvolumen von 50 µl.

## 2.4 Polymerase Kettenreaktionen (PCR)

### 2.4.1 Spezifische Kontroll-PCR

Die Fragmentzusammensetzung von Proben des Fraktionierungsprotokolls wurde mittels spezifischer Oligonukleotidprimer für ausgewählte Mse I-Fragmente (Testfragmente) analysiert (Primersequenzen unter 7.2.3). Für alle der insgesamt 85 Testfragmente wurde der gleiche PCR-Reaktionsansatz sowie standardisierte PCR-Programme („BP“ bzw. „BQ“) verwendet. Dieses Vorgehen wird im Folgenden mit „spezifische Kontroll-PCR“ bezeichnet. Die optimale Annealing-Temperatur ( $T_{\text{anneal}}$ ), die zuvor experimentell bestimmt worden war, wurde für das jeweilige Primerpaar im PCR-Programm eingestellt (z. B.  $T_{\text{anneal}} = 56^{\circ}\text{C} \rightarrow$  PCR-Programm „BP56“). Für die spezifische Kontroll-PCR wurde eine 1:10 Verdünnung einer Fraktion bzw. deren Reamplifizierung als Template benutzt (2.4.3).

**Tab. 3** Spezifische Kontroll-PCR

	Volumen [µl]
PCR-Puffer mit dNTPs (je 1 mM) 10x	1,0
5'-Primer 8 µM	0,5
3'-Primer 8 µM	0,5
BSA	0,25
Panscript Polymerase 5 U/µl	0,1
H <sub>2</sub> O	7,25
Probe 1:10	0,5

Das Programm „BP“ zur spezifischen Kontroll-PCR umfasste folgende Programmschritte in einem Thermocycler:

**Tab. 4** PCR-Programme BP55 - BP64

Temperatur	1 Zyklus	17 Zyklen	19 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	30 sec	30 sec	30 sec
55 – 64°C*	30 sec	30 sec	20 sec	30 sec
72°C	2 min	20 sec	20 sec	2 min

\*:  $T_{\text{anneal}}$  des Primerpaares

Das Programm „BQ“ zur spezifischen Kontroll-PCR für einige Primerpaare, die lange PCR-Produkte erzeugten, umfasste folgende Programmschritte:

**Tab. 5** PCR-Programme BQ62 - BP68

Temperatur	1 Zyklus	17 Zyklen	19 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	30 sec	30 sec	30 sec
62 – 68°C*	30 sec	30 sec	20 sec	30 sec
72°C	2 min	30 sec	30 sec	2 min

\*: T<sub>anneal</sub> des Primerpaares

## 2.4.2 Fraktionierungs-PCR

Die Fraktionierung reichert eine Subpopulation von Mse I-Fragmenten (Fraktion) aus der Gesamtheit aller genomischen Fragmente an. Dazu wurden bis zu drei aufeinander aufbauende Fraktionierungs-PCR durchgeführt. Fraktionierungs-PCR mit verkürzten Primern wurden in einem Thermocycler „Robocycler® 96 Gradient“ (Stratagene) nach den Vorgaben von D. Biener (Biener 2000) vorgenommen. Fraktionierungs-PCR mit mismatch-Primern und fraktionsspezifischen Adaptern wurden in einem Thermocycler „MJ-Research PTC 200“ durchgeführt.

### 2.4.2.1 Fraktionierung mittels mismatch-Primern

Für alle Fraktionen und Fraktionen wurden drei aufeinander folgende Fraktionierungs-PCR (1. - 3. PCR) mit den PCR-Programmen „1. FR-EF/GF“, „2. FR-EF/GF“ und „3. FR-EF/GF“ durchgeführt (Tab. 7). Als Template für die 1. PCR wurde eine Verdünnung einer Mse I-Repräsentation (Ausgangsprobe, 2.8), für die folgenden PCR eine Verdünnung der jeweils vorangegangenen Reaktion verwendet. Es wurden verschiedene Bedingungen bezüglich der Probenverdünnung (1:25, 1:50, 1:75 bzw. 1:100) und des Reaktionsansatzes (Tab. 6), sowie der Annealing-Temperatur und der Zyklenzahl in den Fraktionierungs-PCR getestet (Tab. 7). Die spezifischen Bedingungen zur Gewinnung einzelner Fraktionen mittels mismatch-Primern sind dem Ergebnisteil zu entnehmen (3.5.4).

**Tab. 6** Fraktionierungs-PCR mit mismatch-Primern

	Mix 1+	Mix 1	Mix 2	Mix 3
PCR-Puffer 1*	1x	1x	1x	1x
dNTPs [µM]	100	100	100	25
5'Primer [µM]	0,8	0,4	0,2	0,2
3'Primer [µM]	0,8	0,4	0,2	0,2
BSA [µg/µl]	0,5	0,5	0,5	0,5
Taq Polymerase* [U]	2,5	2,5	2,5	2,5
Probe [µl]	1	1	1	1
Gesamtvolumen [µl]	50	50	50	50

\*: Roche

**Tab. 7** Programme Fraktionierungs-PCR mit mismatch-Primern

<b>1. FR-EF/GF</b>			
Temperatur	1 Zyklus	23 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	40 sec	40 sec
57 - 60°C*	30 sec	30 sec	30 sec
72°C	2 min	1 min 30 sec	2 min
<b>2. FR-EF/GF</b>			
Temperatur	1 Zyklus	13 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	40 sec	40 sec
57 - 60°C*	30 sec	30 sec	30 sec
72°C	2 min	1 min 30 sec	2 min
<b>3. FR-EF/GF</b>			
Temperatur	1 Zyklus	38 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	40 sec	40 sec
57 - 60°C*	30 sec	30 sec	30 sec
72°C	2 min	1 min 30 sec	2 min

\*T<sub>anneal</sub> wurde variiert

### 2.4.2.2 Fraktionierung mittels fraktionsspezifischer Adapter

Bei der Fraktionierung durch fraktionsspezifische Adapter wurden nacheinander eine Fraktionierungs-PCR (1. PCR), ein MBN-Verdau und anschließend eine zweite Fraktionierungs-PCR (2. PCR) durchgeführt. Außerdem wurden Gemischte Fraktionen (GF) ohne MBN-Verdau jedoch mit einem *Hot Start* der 1. PCR hergestellt. Eine zusätzliche Fraktionierungs-PCR wurde gelegentlich bei den GF angewendet (3. PCR).

#### 2.4.2.2.1 Fraktionierung mit MBN-Verdau

Bei diesem Vorgehen wurden für die 1. und 2. PCR die Reaktionsansätze A (Einfache Fraktionen, EF) bzw. B (GF) aus Tab. 8 gewählt. Template für die 1. PCR waren Produkte einer Auffüllreaktion an paramagnetischen Partikeln (2.3.3.2). Nach der Auffüllreaktion wurden die paramagnetischen Partikel sorgfältig gewaschen (2.10.2.2) und im Reaktionsansatz der 1. PCR resuspendiert. Nach der 1. PCR wurde ein MBN-Verdau durchgeführt (2.2.3), von dem anschließend 20 µl als Template in die 2. PCR eingesetzt wurden. Die verwendeten PCR-Programme umfassten 15 bis 25 Zyklen (Tab. 9).

#### 2.4.2.2.2 Fraktionierung mit Hot-Start

Für eine Gemischte Fraktionierung mit *Hot Start* wurde der Reaktionsansatz C (Tab. 8) verwendet. Template für die 1. PCR waren Produkte einer Quick Ligation (2.3.2.2) an paramagnetischen Partikeln, die keiner Auffüllreaktion unterzogen worden waren. Die Partikel wurden unmittelbar vor der 1. PCR mit dem vom Hersteller empfohlenen Waschprotokoll gewaschen (2.10.2.2), dann an einem Magneten vom Waschpuffer getrennt und mit dem Reaktionsansatz der 1. Fraktionierungs-PCR gemischt. Die 1. PCR wurde mit einem *Hot Start* begonnen. Dazu wurde die Probe zunächst für 1 min bei 94°C denaturiert und dann auf 80°C abgekühlt. Dann wurden 1 µl Polymerase Mix (Roche) in 4 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und das PCR-Programm gestartet. Die DNA-Matrize für die 2. PCR waren 5 µl der 1. PCR. Die verwendeten PCR-Programme umfassten 20 und 25 Zyklen (Tab. 9).

**Tab. 8** Fraktionierungs-PCR an fraktionsspezifischen Adaptern: Reaktionsansätze

		(A) EF	(B) GF	(C) GF
	PCR-Puffer 1	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
	23R'1 (8 µM)	5,0 µl	2,5 µl	5,0 µl
	23R'2 (8 µM)	—	2,5 µl	5,0 µl
	dNTPs (10 mM)	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
	BSA	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
	Polymerase Mix	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
	Template aus			
<b>1. PCR</b>	Ligation	Partikel**	Partikel**	Partikel**
<b>2. PCR</b>	MBN-Verdau bzw. 1. PCR	20,0 µl —	20,0 µl —	— 5,0 µl
<b>3. PCR</b>	2. PCR	—	Partikel <sup>(*)</sup>	—
	H <sub>2</sub> O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

\*: Hot Start: 1,0 µl Pol Mix in 4,0 µl H<sub>2</sub>O bei 80°C zugeben; \*\*: Reaktionsansatz mit paramagnetischen Partikeln mischen

**Tab. 9** Programme Fraktionierung (fraktionsspezifische Adapter)

<b>1. PCR-EF/GF</b>					
Temperatur	<b>EF:</b> 15 Zyklen <b>GF:</b> 20 Zyklen	1 Zyklus			
94°C	40 sec	—			
58°C	30 sec	—			
68°C	1 min 40 sec + sec/Zyklus	3 min 40 sec			
<b>1. PCR-GF Hot Start</b>					
Temperatur	1 Zyklus	Temperatur	1 Zyklus	19 Zyklen	1 Zyklus
94°C	1 min	94°C	40 sec	40 sec	—
80°C	30 sec	60°C	30 sec	30 sec	—
—	—	68°C	1 min 30	1 min 20 sec + 1 sec/Zyklus	3 min 40 sec
<b>2. PCR-EF/GF</b>					
Temperatur	15 Zyklen	9 Zyklen	1 Zyklus	1 Zyklus	
94°C	40 sec	40 sec	40 sec	—	
60°C	30 sec	30 sec	30 sec	—	
68°C	1 min 30 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus	1 min 53 sec	3 min 40 sec	
<b>3. PCR-GF</b>					
Temperatur	20 Zyklen	1 Zyklus			
94°C	40 sec	—			
60°C	30 sec	—			
68°C	1 min 40 sec + 1 sec/Zyklus	3 min 40 sec			

## 2.4.3 Reamplifizierung und J20n-PCR

### 2.4.3.1 Reamplifizierung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Reaktionen zur Anreicherung von PCR-Produkten (Reamplifizierung) eingesetzt, die sich in den Reaktionsansätzen und der Zyklenzahl unterschieden.

PCR-Produkte aus einer Mse I-Adapter PCR (2.8) wurden im Verhältnis 1:25 mit PCR-H<sub>2</sub>O verdünnt und als Template in eine Reamplifizierung eingesetzt. Es wurden acht Reaktionsansätze (Tab. 10A)

angefertigt und dann das Template mit dem PCR-Programm „SHORTRLP“ in einem Thermocycler amplifiziert (Tab. 11A). PCR-Produkte aus Fraktionierungs-PCR wurden im Verhältnis 1:10 mit PCR-H<sub>2</sub>O verdünnt und als Template in eine Reamplifizierung eingesetzt. Es wurden sechs bis vierzig Reaktionsansätze angefertigt (Tab. 10B) und dann das Template mit dem PCR-Programm „Reamp60“ in einem Thermocycler amplifiziert (Tab. 11B). Die Ausbeute der Reamplifizierungen lag bei ca. 80 - 120 ng/μl. Nach ihrer Reamplifikation wurden bis zu acht Ansätze gemischt und über eine Microcon YM-30 Filtereinheit (Amicon) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 2.4.3.2 J20n-PCR

Die J20n-PCR diente der Anreicherung von DNA-Fragmenten vor einem Restriktionsverdau mit Dra I, Vsp I, Ksp AI oder Bsp TI (2.2.2). Dazu wurde das Produkt einer Quick Ligation von 800 ng DNA aus einem Mse I-Verdau, (2.2.1) mit J24n-Adapttern (2.3.2.2, Tab. 2A) und anschließend in einen PCR-Ansatz eingesetzt, der einen spezifischen Primer (J20n) für die J24n-Sequenz enthielt (Tab. 10C). Das Programm für die J20n-PCR ist Tab. 11 zu entnehmen. Die Ausbeute der J20n-PCR lag in der Regel bei ca. 100 ng/μl.

**Tab. 10** Reamplifizierungen und J20n-PCR

	(A) SHORTRLP	(B) Reamp60	(C) J20n-PCR
PCR-Puffer 1	5,0 [μl]	5,0 [μl]	5,0 [μl]
5'Primer (10 μM)*	5,0 [μl]	10,0 [μl]	5,0 [μl]
3'Primer (10 μM)*	—	10,0 [μl]	—
dNTPs (10 mM)	2,0 [μl]	3,0 [μl]	2,0 [μl]
BSA	1,25 [μl]	1,25 [μl]	1,25 [μl]
Polymerase**	0,75 [μl]	0,75 [μl]	1,0 [μl]
Template	1,0 [μl]	1,0 [μl]	2,5 [μl]
H <sub>2</sub> O	35,0 [μl]	20,0 [μl]	33,25 [μl]

\*: A) Lib1; B) Fraktionierungsprimer, C) J-20n; \*\*: A) und C) Polymerase Mix (5 U/μl); B) Taq Polymerase (5 U/μl)

**Tab. 11** Programme für Reamplifizierungen und J20n-PCR

(A) SHORTRLP				
Temperatur	1 Zyklus	13 Zyklen		
94°C	1 min	30 sec		
60°C	30 sec	30 sec		
68°C	2 min	2 min + 20 sec/Zyklus		
(B) Reamp60				
Temperatur	1 Zyklus	19 Zyklen	9 Zyklen	1 Zyklus
94°C	1 min	30 sec	30 sec	—
60°C	30 sec	30 sec	30 sec	—
68°C	2 min	1 min 30 sec	2 min + 5 sec/Zyklus	2 min 30 sec
(C) J20n-PCR				
Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen	7 Zyklen	1 Zyklus
94°C	—	40 sec	40 sec	—
57°C	—	30 sec	30 sec (+ 1°C/Zyklus)	—
68°C	3 min	1 min 30 sec+ 1 sec/Zyklus	1 min 45 sec + 1 sec/Zyklus	3 min 40 sec

## 2.4.4 Quantitative PCR

Für die Quantitative PCR (qPCR) wurden *LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I* Reagenzien, sowie Glaskapillaren (*LightCycler® Capillaries*) und ein Thermocycler (LightCycler®) der Firma Roche verwendet. Es wurden nur solche Primer eingesetzt, die den üblichen Qualitätsstandards entsprachen, also weder unspezifische Produkte noch Primerdimere während der Reaktion erzeugten. Die Produkte der qPCR waren zwischen 76 und 133 bp lang (siehe 7.2.3). Proben wurden in zwei oder drei Replikaten von 20 µl Volumen nach Herstellerangaben gemessen (Reaktionsansatz siehe Tab. 12, PCR-Programm siehe Tab. 13).

**Tab. 12** qPCR

	Volumen [µl]
H <sub>2</sub> O	11,1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4
5'-Primer	1,25
3'-Primer	1,25
PCR-Master Mix 1	2
Template	2

**Tab. 13** Programm qPCR

Temperatur	1 Zyklus	40 Zyklen	Schmelzkurve:	1 Zyklus
95°C	8 min	10 sec	—	—
60°C	—	5 sec	65°C	1 min
72°C	—	10 sec	heizen auf 95°C	0,1°C/sec

## 2.5 Gelelektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

### 2.5.1 Gelelektrophorese

#### 2.5.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels horizontaler Elektrophorese in einem Agarosegel (1,5% Agarose in 1x TBE) der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden 10 µl PCR-Produkt mit 2 µl Ladepuffer (enthält Bromphenolblau, siehe 2.1.5) und 1 µl Sybr Gold (1:1600 Stock-Lösung in DMSO) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Nach der Elektrophorese (160 V, 400 mA, 45 min) wurde die DNA mit Hilfe eines UV-Transilluminators (INTAS) sichtbar gemacht und das Gel digital photographiert.

#### 2.5.1.2 Acrylamid-Gelelektrophorese

Um Restriktionsenzymfragmente mit einer Länge > 100 bp sichtbar zu machen, wurden sie auf ein Acrylamidgel (7%) aufgetragen und in einer vertikalen Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Vorbereitung der Elektrophoresekammer sowie des Gels entsprach den *Current Protocols in Molecular Biology (CP) 2.7, Basic Protocol 1* (2005). Eine Glasplatte wurde mit 500 ml Repel-Silane beschichtet und anschließend mehrfach mit 70% Ethanol geputzt. Eine weitere Glasplatte wurde mit

400 µl Bind-Silane-Lösung und 100 µl Natriumacetat-Lösung (10%) beschichtet und ebenfalls mehrfach mit 70% Ethanol geputzt. 25 µl einer PAA-Gel Stammlösung wurden mit 250 µl APS (10%) und 20 µl TEMED gemischt, zwischen die zusammen geklammerten Glasplatten gegeben und 45 – 60 min stehen gelassen. 5 µl der Probe wurden mit 2 - 4 µl Laufpuffer (2.1.5) gemischt, in die Geltaschen gefüllt und eine Spannung von 1600 Volt bei 30 mA Strom für 1,5 h angelegt. Im Anschluss wurde das Gel mit 4 µl Sybr-Gold (Molecular Probes) in 50 ml TBE (1x) überschichtet und 10 min gefärbt. Auf einem UV-Scanner (Fluor Imager SI) wurden die DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht.

## **2.5.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren**

### **2.5.2.1 Extraktion von DNA-Banden aus Agarosegelen**

Zur Aufreinigung von PCR-Produkten einer definierten Größe (einer Bande) aus Agarosegelen wurde eine Gelextraktion mit dem *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) durchgeführt. Nach der Gelelektrophorese wurde die gewünschte DNA-Bande auf einem UV-Transilluminator mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Aufreinigen der DNA-Bande wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde anschließend in einem Volumen zwischen 25 und 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

### **2.5.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Mit Hilfe einer Phenol/Chloroform-Extraktion wurden Proteine aus Nukleinsäurelösungen abgetrennt. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung auf ein Volumen von 400 µl mit PCR-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) im Verhältnis 1:2 mit einem Gemisch aus Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, C. Roth) versetzt. Nach einer 10 sec langen Vermischung der beiden Phasen auf dem Vortexer wurde die Probe bei 14000 rpm für 3 min zentrifugiert und der wässrige Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Dieses Verfahren wurde noch zweimal wiederholt, wobei der Überstand jeweils mit Chloroform (Sigma-Aldrich) im Verhältnis 1:2 gemischt wurde. Der Überstand der letzten Chloroform-Extraktion wurde mit Ethanol gefällt (2.5.2.3).

### **2.5.2.3 Fällung von Nukleinsäuren**

Die Fällung von Nukleinsäuren mit Ethanol folgte auf eine Phenol/Chloroform-Extraktion zum Entfernen von Chloroformrückständen und zur Reduktion des Volumens einer Probe. Dazu wurde sie sorgfältig mit 1/5 Volumen 10 M Ammoniumacetat gemischt, dann das 2,25fache Volumen Ethanol (absolut, J. T. Baker) zugegeben und wieder gemischt. Der Ansatz wurde für mindestens 5 h oder über Nacht bei –20°C inkubiert. Die Pelletierung der DNA erfolgte bei 14000 Upm und 4°C für 45 min in einer Tischzentrifuge (5402, Eppendorf). Das Pellet wurde zweimal mit je 700 µl 70% Ethanol (–20°C) für 10 min bei RT inkubiert, und anschließend für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Mit offenem Deckel wurde das Pellet für ca. 5 min bei 50°C im Blockthermostaten (HLC) getrocknet, bis keine



Ethanolreste mehr vorhanden waren. Die DNA wurde im gewünschten Volumen Puffer oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Eine sensitive Konzentrationsbestimmung niedrig konzentrierter Nukleinsäurelösungen leistet eine Intensitätsmessung mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz. In dieser Arbeit wurde dazu der Doppelstrang-DNA bindende Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen (*PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA Quantitation Reagent*, Molecular Probes) eingesetzt. In einem Software-gesteuerten Spektrofluorimeter (GENios pro mit Software Magellan, Tecan) wurde der Fluoreszenzfarbstoff mit Licht der Wellenlänge 480 nm angeregt und die Emission bei 520 nm gemessen. Die Intensitäten wurden mit bekannten Konzentrationen einer Standardkurve abgeglichen. Um Ungenauigkeiten durch Pipettierfehler zu minimieren, wurden Proben in Duplikaten oder Triplikaten gemessen. Für die Referenzproben der Standardkurve wurde DNA aus Heringsperma (Gibco) mit TE (1x, pH 7,4) auf Konzentrationen von 1000, 200, 20, 2 und 0 ng/ml verdünnt. Die Nukleinsäurelösung unbekannter Konzentration wurde im Verhältnis 1:5 mit H<sub>2</sub>O und dann im Verhältnis 1:100 mit TE verdünnt. Diese Verdünnungen der Proben und Referenzproben wurden im Verhältnis 1:2 mit einer PicoGreen-TE Lösung (PicoGreen 1:1000 in TE, 2.1.5) gemischt.

Die Messung wurde in einer schwarzen Mikroplatte (96-Well, Flachboden, Greiner Bio One) in einem Probenvolumen von je 200 µl durchgeführt. Es wurden stets eine Standardkurve und ein Leerwert (TE und PicoGreen-TE Lösung im Verhältnis 1:2) in eine Messung eingeschlossen. Die Konzentrationen der Standardkurve wurden in der Software Magellan mit 500, 100, 10, 1 und 0 ng/ml angegeben. Für die Proben wurde ein Verdünnungsfaktor von 1:1000 in der Software angegeben.

## 2.6 Transformation kompetenter Bakterien

### 2.6.1 Chemokompetente Bakterien

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli* wurde gemäß Protokoll 25 aus *Molecular Cloning, Third Edition* (Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt. Dabei wurde die empfohlene MgCl<sub>2</sub>-CaCl<sub>2</sub> Lösung durch TFB I-Puffer (frisch filtriert, siehe 2.1.5) und die 0,1 M CaCl<sub>2</sub> Lösung durch TFB II-Puffer ersetzt (2.1.5). Die Zellen wurden direkt für Transformationen mit Plasmid-Vektoren verwendet oder in Aliquots von 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -80°C gelagert.

### 2.6.2 Transformation

DNA-Fragmente wurden mittels *Quick Ligation<sup>TM</sup> Kit* (New England Biolabs) in den Transformationsvektor *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* eingebracht (nach Herstellerangaben bzw. 2.3.2.2). Währenddessen wurden chemokompetente *E. coli* (100 µl; 2.6.1) auf Eis angetaut, anschließend wurde der Ligationsansatz vorsichtig zugeben und das Gemisch für 7 min auf Eis gekühlt. Dann wurden die Zellen für 5 min bei 37°C inkubiert und nach der Zugabe von 900 µl LB-Medium (2.1.5) nochmals für

45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden je 10% und 90% eines Transformationsansatzes auf LB-Platten, die Ampicillin in der Konzentration 100 µg/ml enthielten, ausgestrichen (*CP, 1.3 Basic Protocol 3*). Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden einzelne *E. coli* Kolonien mit Hilfe einer Pipettenspitze in 50 µl LB-Medium überführt und resuspendiert.

### 2.6.3 Screening-PCR und Plasmidpräparation

Nach einer Transformation wurden *E. coli* Klone (2.6.2) in einer „Screening-PCR“ auf eine erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragments in den Plasmidvektor getestet. Dazu wurde insgesamt 1 µl des in 50 µl LB resuspendierten Klons in einen doppelten Reaktionsansatz nach 2.4.1 gegeben. Die Screening-PCR wurde in einem Robocycler® 96 Gradient (Stratagene) mit den Oligonukleotidprimern M13-forward und M13-reverse durchgeführt, welche in der Vektorsequenz binden (Tab. 14). Anschließend wurde das PCR-Produkt in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

**Tab. 14** Screening-PCR

Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	9 Zyklen	1 Zyklus
94°C	6 min	40 sec	40 sec	40 sec
50°C	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
72°C	2 min	1 min	1 min 30 sec	4 min

Je 25 µl der Klone, die die Insertion eines DNA-Fragments zeigten, wurden in 4 ml LB mit 100 µg/ml Ampicillin (Biomol) bei 37°C im Bakterienschüttler über Nacht in Kultur genommen. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur bei 3000 Upm und 4°C für 10 min in einer Zentrifuge (Rotix RP, Hettich) pelletiert. Die Plasmid-DNA wurde abschließend mit Hilfe des *Plasmid Minipräp Kit* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert und die Sequenz des Inserts von der Firma Sequiserve (Vaterstetten) sequenziert.

## 2.7 Nachweis von Zielsequenzen mittels spezifischer DNA-Sonden

Das Vorhandensein einer bestimmten DNA-Sequenz (Zielsequenz) in einer Probe wurde mit Hilfe einer spezifischen DNA-Sonde nachgewiesen, indem eine Hybridisierung beider DNA-Moleküle mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht wurde. Dazu wurde die Probe zunächst mittels Southern Blot auf eine Nylonmembran übertragen und dann mit einer spezifischen Digoxigenin-markierten DNA-Sonde inkubiert. Anschließend wurde ein Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub> Fragment zu der Membran gegeben, das mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, und dann das Substrat für die Alkalische Phosphatase zugegeben. Die durch die Substratreaktion entstandene Chemilumineszenz wurde durch Belichtung eines Röntgenfilmes nachgewiesen.

### 2.7.1 Southern-Blot

PCR-Produkte wurden auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und in einem Southern Blot über Nacht auf eine Nylonmembran (Roche) übertragen. Der Aufbau der Blottingkonstruktion und das experimentelle Vorgehen erfolgten nach *CP 2.9A Basic Protocol (Method B)*. Der Puffer in der Blottingkonstruktion war 20x SSC, die Membran wurde mit 2x SSC befeuchtet. Am Folgetag wurde die Konstruktion abgebaut und das Gel auf einem UV-Transilluminator (INTAS) auf verbleibende DNA untersucht. Wenn die gesamte DNA auf die Nylonmembran übertragen worden war, wurde sie mittels UV-Licht kreuzvernetzt (Stratalinker® 2400 UV Crosslinker, Stratagene).

### 2.7.2 Hybridisierung von spezifischen DNA-Sonden

Um auf einer Nylonmembran aus einem Southern-Blot (2.7.1) Zielsequenzen mittels spezifischer DNA-Sonden nachzuweisen, wurde zuerst eine Prähybridisierungslösung aus 5 ml *DIG Easy Hyb*-Lösung (Roche) und 50 ng/μl Heringsperma DNA (Gibco) für 5 min bei 94°C denaturiert. Dann wurde die Membran mit der Prähybridisierungslösung in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra) und für mindestens 1 h in einem Hybridisierungsofen (Shake "n" Stack, Thermo Electron) bei 45°C geschwenkt.

Zur Herstellung einer DNA-Sonde wurde ein 5facher Ansatz einer spezifischen Kontroll-PCR (2.4.1) mit Primern für die Zielsequenz durchgeführt (Tab. 15). Das PCR-Produkt wurde mittels Gelextraktion aufgereinigt (2.5.2.1) und anschließend in einer Labeling-PCR durch den Einbau von Digoxigenin-gekoppeltem Uridintriphosphat (dig-11-dUTP, Roche) markiert. Dazu wurde ein Reaktionsansatz gemäß Tab. 16 und Tab. 17 hergestellt und die Labeling-PCR in einem Thermocycler gemäß 2.4.3 durchgeführt (Programm „SHORTRLP“).

**Tab. 15** Primerpaare für spezifische DNA-Sonden

Zielsequenz	Primerpaar	Sequenz 5'→3'
BCR-ABL Bruchpunkt- Fragment	K562-5'III	AGG AAG GAC TCA TCG GGC AG
	K562-3'	TCT GTT TGG GTA TGG AAG CTG
GFPmut I-Fragment	GFP test 5'	GAC CCT GAA GTT CAT CTG CA
	GFP test 3'	TGT TGT AGT TGT ACT CCA GCT
GFPmut II-Fragment	GFP forward	TAT ATC ATG GCC GAC AAG CA
	GFP reverse n	CTC AGG GCG GAC TGG GTG C

**Tab. 16** Labeling-PCR

	Volumen [μl]
PCR-Puffer 1	5,0
5'-Primer 8 μM	2,5
3'-Primer 8 μM	2,5
dig-11-dUTP	2,5
1/7 Mix (Tab. 17)	1,75
Taq Polymerase 5 U/μl	0,5
Template	1,0
H <sub>2</sub> O	34,25

**Tab. 17** 1/7 Mix

	Volumen [μl]
dATP 100 μM	5,0
dGTP 100 μM	5,0
dCTP 100 μM	5,0
dTTP 100 μM	4,2
H <sub>2</sub> O	30,0

Zur Hybridisierung der spezifischen DNA-Sonde mit der Zielsequenz wurde eine Hybridisierungslösung aus 6 ml *DIG Easy Hyb*-Lösung (Roche) und 20 µl PCR-Produkt aus einer Labeling-PCR für 5 min bei 94°C denaturiert und anschließend mit der Membran in einem Hybridisierungsröhrchen (Biometra) über Nacht in einem Hybridisierungssofen (Shake "n" Stack, Thermo Electron) bei 45°C geschwenkt. Die Membran wurde am nächsten Tag mit je 4 – 5 ml vorgewärmter Waschlösung absteigender Salzkonzentration in einem Hybridisierungssofen bei 68°C geschwenkt: kurz mit 2x SSC + 0,1% SDS und 1x SSC + 0,1% SDS, danach 15 min mit 0,5x SSC + 0,1% SDS und 2x 30 min mit 0,1x SSC + 0,1% SDS. Die Membran wurde anschließend bei RT für 30 min in Blocklösung (2.1.5) und nach Zugabe von 2,5 µl eines Anti-Digoxigenin-F<sub>ab</sub> Fragments (*Dig Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids*, Roche) nochmals 30 min auf einem Schüttelinkubator (Celloshaker Variospeed, Chemotron) bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran für 2x 15 min in Puffer 1-Tween-Lösung (2.1.5), dann 2x für ca. 30 sec in frisch hergestelltem Puffer 3 (2.1.5) gewaschen und vorsichtig auf ein Stück PVC-Folie gelegt. Überschüssige Flüssigkeit wurde abgetupft. Daraufhin wurden 3,5 µl CSPD (Substrat der Alkalischen Phosphatase, Roche) mit 371 µl Puffer 3 gemischt und auf der Membran verteilt. Die Folie wurde luftblasenfrei über der Membran geschlossen und für 5 min bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm (Biomax Light Film, Kodak) auf die Membran gelegt und nach Belichtungszeiten von ca. 20 sec bis 3 min entwickelt.

## **2.8 Genomische Mse I-Repräsentationen**

DNA aus einzelnen Zellen wurde nach dem veröffentlichten Protokoll zur Mse I-Adapter-PCR (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999) und der Modifikation zur Einführung des Lib1-Adapters (Klein, Blankenstein et al. 2002) amplifiziert (Mse I-Repräsentationen). Die Isolierung einzelner Zellen aus Blut bzw. von Haft-Objektträgern erfolgte ebenfalls nach diesen Angaben.

## **2.9 Testsysteme zur Methodenetablierung**

Zur Evaluation des Subtraktionsprotokolls nach Lisitsyn, Lisitsyn et al. wurden Fraktionen aus Fragmentgemischen bekannter Zusammensetzung (Tester- und Driverpools, 2.9.3) hergestellt und in die Subtraktion eingesetzt. Die Tester- und Driverpools dieser Testsysteme enthielten DNA aus Mse I-Repräsentationen (2.8) von normalen Zellen. Die Testerpools enthielten zusätzlich differentielle Mse I-Fragmente, deren Nachweis mit der Subtraktion erbracht werden sollte. Es wurden verschiedene Testsysteme verwendet, die im Folgenden vorgestellt werden.

### **2.9.1 Das BCR-ABL Bruchpunktfragment als differentielle Sequenz**

Das BCR-ABL Testsystem stellte eine Positivkontrolle für den Nachweis eines humanen Fragmentes mit einem Translokationsbruchpunkt mit der hier vorgestellten Methode dar. Das Mse I-Fragment, das

den BCR-ABL Bruchpunkt der Translokation t(9;22) enthält, wurde aus der humanen Zelllinie K562 (Chronisch Myeloische Leukämie) gewonnen und als differentiell Fragment eingesetzt.

### 2.9.1.1 Isolieren des BCR-ABL Fragments aus dem K562-Genom

Das Mse I-Fragment, auf dem der BCR-ABL Bruchpunkt liegt, wurde aus genomischer DNA von K562-Zellen mit Hilfe von PCR-Primern angereichert, die die Mse I-Schnittstellen links und rechts des Bruchpunktes flankierten. Die Differenzierungsbasen (Definition siehe Ergebnisteil, 3.1.1) der Sequenz wurden dabei durch einen Basenaustausch in der Primersequenz verändert, so dass PCR-Produkte entstanden, die jeweils einer Fraktion zugehörig waren. Diese wurden nach einem Mse I-Verdau mit Lib1-Adaptoren versehen, amplifiziert und je einem Testerpool zugegeben. Zum spezifischen Nachweis der BCR-ABL Fragmente dienten die Primer K562-3' und K562-5'III (Tab. 18).

Aus einer Suspensionskultur der Zelllinie K562, bei der als Medium 10% FCS (PAA Laboratories) in RPMI 1640 (Gibco) mit 200 µg/ml Penicillin und Streptomycin (PAA Laboratories) verwendet wurde, wurden  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen zweimal mit PBS (1x) gewaschen und dann in 100 µl Lösung A aufgenommen. Dann wurden sie mit Lösung B gemischt und mit 500 µg/ml Proteinase K (Roche) versetzt. Es folgte eine Inkubation für 12 h bei 42°C, anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 80°C inaktiviert. Je 1 µl dieser Probe wurde in zehn doppelte Ansätze spezifische Kontroll-PCR (2.4.1) als Template eingesetzt. Hierbei wurden zehn Kombinationen von Oligonukleotidprimern verwendet, die jeweils eine andere Kombination von Differenzierungsbasen in die Fragmente einfügten (bcr abl 5' und -3', siehe Tab. 19). Die PCR wurde wie in Tab. 20 beschrieben in einem "Robocycler® 96 Gradient" durchgeführt. Es folgte eine Gelextraktion der spezifischen PCR-Produkte und eine Konzentrationsbestimmung des Eluats (2.5.3).

**Tab. 18** Sequenzen BCR-ABL N-Oligonukleotide\*

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
BCR-ABL 5'-A	CTGGATTAA <u>A</u> CAGAGTTCA
BCR-ABL 5'-T	CTGGATTAA <u>T</u> CAGAGTTCA
BCR-ABL 5'-C	CTGGATTAA <u>C</u> CAGAGTTCA
BCR-ABL 5'-G	CTGGATTAA <u>G</u> CAGAGTTCA
BCR-ABL 3'-A	GAAAATCCTTAA <u>A</u> GGTATTTCTG
BCR-ABL 3'-T	GAAAATCCTTAA <u>T</u> GGTATTTCTG
BCR-ABL 3'-C	GAAAATCCTTAA <u>C</u> GGTATTTCTG
BCR-ABL 3'-G	GAAAATCCTTAA <u>G</u> GGTATTTCTG
K562-5'III	AGGAAGGACTCATCGGGCAG
K562-3'	TCTGTTTGGGTATGGAAGCTG

\*unterstrichene Basen markieren veränderte Differenzierungsbasen

**Tab. 19** BCR-ABL Fragmente: Oligonukleotidkombinationen

BCR-ABL Fragmente	
Diff.-basen	Oligonukleotide
AT	BCR-ABL 5'-A + bcr abl 3'-T
AC	BCR-ABL 5'-A + bcr abl 3'-C
AG	BCR-ABL 5'-A + bcr abl 3'-G
TC	BCR-ABL 5'-T + bcr abl 3'-C
TG	BCR-ABL 5'-T + bcr abl 3'-G
GC	BCR-ABL 5'-G + bcr abl 3'-C
AA	BCR-ABL 5'-A + bcr abl 3'-A
TT	BCR-ABL 5'-T + bcr abl 3'-T
CC	BCR-ABL 5'-C + bcr abl 3'-C
GG	BCR-ABL 5'-G + bcr abl 3'-G

**Tab. 20** PCR-Programm zur Anreicherung der BCR-ABL Fragmente

Temperatur	1 Zyklus	14 Zyklen	24 Zyklen	1 Zyklus
94°C	2 min	40 sec	40 sec	40 sec
47-54°C*	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec
72°C	2 min	20 sec	30 sec	2 min

\*T<sub>anneal</sub> AC: 47°C; CC, AT, TC, TG, GC: 50°C; AA, AG: 53°C; TT, GG: 54°C

Anschließend wurden ca. 100 - 200 µg (maximal jedoch 2 µl Eluat) mit Mse I verdaut (2.2.1), mit Lib1-Adaptoren ligiert (2.3.2.1) und 38 Zyklen PCR unterzogen (Programm „BP60“, 2.4.1). Das PCR-Produkt wurde mittels Gelextraktion gereinigt, in 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert und seine Konzentration mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz ermittelt (2.5.2.1 und 2.5.3). Nach einer Transformation in kompetente Bakterien und anschließender Plasmidpräparation wurden die Fragmente sequenziert (2.6.2 - 2.6.3).

## 2.9.2 Mse I-Fragmente aus GFP als differentielle Sequenzen

Aus dem GFP-Gen der Qualle *Aequorea victoria* wurden zwei Mse I-Fragmente (GFPmut I und GFPmut II) gewonnen und als differentielle Sequenzen in Testerpools eingesetzt. Das GFPmut-Testsystem stellte eine Positivkontrolle für den Nachweis nichthumaner Fragmente mit der hier beschriebenen Methode dar.

### 2.9.2.1 Isolieren von Mse I-Fragmenten aus dem GFP-Gen

Da das GFP-Gen selbst über keine Mse I-Schnittstellen verfügt, wurden Abschnitte des Gens mit zwei spezifischen PCR-Primern amplifiziert, die durch den Austausch einer Nukleobase jeweils eine Mse I-Schnittstelle in das PCR-Produkt einfügten. Mit den Primern GFPmut I 5' und 3' wurde ein Fragment von 429 bp Länge mit den Differenzierungsbasen AA amplifiziert (GFPmut I). Im Falle der Primer GFPmut II 5' bzw. 3' handelt es sich bei dem PCR-Produkt um ein Fragment von 414 bp mit den Differenzierungsbasen AT. Beide wurden anschließend als Template in weitere PCR eingesetzt, in denen – wiederum durch den Austausch einer Nukleobase in den Primern – neue Differenzierungsbasenkombinationen in die PCR-Produkte eingefügt wurden. Diese wurden nach einem Mse I-Verdau mit Lib1-Adaptoren ligiert, amplifiziert und dann den Testeransätzen zugegeben.

Der spezifische Nachweis der GFPmut I-Fragmente erfolgte mit dem Primerpaar „GFP-test“, der GFPmut II-Fragmente mit „GFP forward/reverse n“ (Tab. 22) gemäß 2.4.1.

Bei der Herstellung der GFPmut-Fragmente diente ein *pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System I* (Promega) mit integriertem GFP-Gen (0,1 ng/μl) als Template für einen 3fachen Ansatz „Spezifische Kontroll-PCR“ (2.4.1), die mit den Primern GFPmut I 5' und -3' (bzw. GFPmut II 5' und -3') durchgeführt wurde (Tab. 22). Nach Ablauf des PCR-Programms („BP58“, Tab. 4), wurden die Fragmente mittels Gelextraktion (2.5.2.1) aus einem 1,5% Agarosegel isoliert und in 50 μl H<sub>2</sub>O eluiert. Zur Änderung der Differenzierungsbasen wurde eine 1:1000 Verdünnung des Eluats (in H<sub>2</sub>O) in einem 5fachen Ansatz spezifische Kontroll-PCR mit den Primern „GFP I N“ bzw. „GFP II N“ (N = A, T, C oder G, Tab. 22) amplifiziert („BP58“). Die Produkte wurden wiederum im Verhältnis 1:1000 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und die PCR wiederholt, um die ursprüngliche DNA-Matrize abzureichern. Es folgte erneut eine Gelextraktion mit Elution in 15 μl H<sub>2</sub>O und eine Konzentrationsbestimmung der GFPmut-Fragmente. Um die GFPmut-Fragmente mit Lib1-Adaptoren auszustatten, wurden ca. 100 - 200 μg (maximal jedoch 2 μl Eluat) mit Mse I verdaut (2.2.1), dem Lib1-Adapter ligiert (2.3.2.1) und anschließend unter Verwendung des Lib1-Primers 38 Zyklen PCR unterzogen (Reaktionsansatz 2.4.3.1, Tab. 10A, Programm „BP60“, Tab. 4). Das Produkt wurde mittels Gelextraktion gereinigt, in 40 μl H<sub>2</sub>O eluiert und seine Konzentration mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz ermittelt (2.5.3).

**Tab. 21** Sequenzen der GFP-Primer

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'
GFP mut I 5'	GCTGGACGGCGACTTAAACG
GFP I T5'	CTTAATCGGCCACAAGTTCA
GFP I C5'	CTTAACCGGCCACAAGTTCA
GFP I G5'	CTTAAGCGGCCACAAGTTCA
GFP mut I 3'	TGGCGGATCTTAAAGTTCACC
GFP I T3'	TTTAAITGTTACCTTGATGC
GFP I C3'	TTTAACGTTACCTTGATGC
GFP I G3'	TTTAAGGTTACCTTGATGC
GFP mut II 5'	GCACCATCTTCTTAAAGGAC
GFP II T5'	CTTAATGGACGACGGCAACT
GFP II C5'	CTTAACGGACGACGGCAACT
GFP II G5'	CTTAAGGGACGACGGCAACT
GFP mut II 3'	GGCCGCTTTAATTGTACAGC
GFP II A3'	TTTAAATGTACAGCTCGTCC
GFP II C3'	TTTAACTGTACAGCTCGTCC
GFP II G3'	TTTAAGTGTACAGCTCGTCC
GFP-test 5'	GACCCTGAAGTTCATCTGCA
GFP-test 3'	TGTTGTAGTTGTACTCCAGCT
GFP forward	TATATCATGGCCGACAAGCA
GFP reverse n	CTCAGGGCGGACTGGGTGC

unterstrichen: veränderte Basen

**Tab. 22** GFPmut Fragmente: Oligonukleotidkombinationen

Diff.-basen	GFPmut I	GFPmut II
AT	GFP mut I 5' + GFP I T3'	GFP mut II 5' + GFP mut II 3'
AC	GFP mut I 5' + GFP I C3'	GFP mut II 5' + GFP II C3
AG	GFP mut I 5' + GFP I G3'	GFP mut II 5' + GFP II G3'
TC	GFP I T5' + GFP I C3'	GFP II C5' + GFP mut II 3'
TG	GFP I T5' + GFP I G3'	GFP II G5' + GFP mut II 3'
GC	GFP I G5' + GFP I C3'	GFP II G5' + GFP II C3'
AA	GFP mut I 5' + GFP mut I 3'	GFP mut II 5' + GFP II A3'
TT	GFP I T5' + GFP I T3'	GFP II T5' + GFP mut II 3'
CC	GFP I C5' + GFP I C3'	GFP II C5' + GFP II C3'
GG	GFP I G5' + GFP I G3'	GFP II G5' + GFP II G3'

### 2.9.3 Herstellen von Tester- und Driverpools

Die Tester- und Driverpools wurden aus einem DNA-Fragmentgemisch hergestellt, das aus Mse I-Repräsentationen von einzelnen Normalzellen gewonnen wurde (Lymphopool, LP). Dazu wurden je sechs CD3<sup>+</sup> und CD19<sup>+</sup> Lymphozyten (Färbung mittels direkt markierter Antikörper) von Haft-Objektträgern per Mikromanipulation isoliert und ihre Mse I-Repräsentationen angefertigt (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999; Klein, Blankenstein et al. 2002), und diese dann zu gleichen Teilen gemischt. Für einen Driverpool wurde die Probe LP im Verhältnis 1:25 mit H<sub>2</sub>O verdünnt. Für einen Testerpool wurden 4 µl LP mit 95 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl einer Verdünnung eines differentiellen Fragments gemischt (2.9.5, 2.9.5). Pro Testsystem wurden drei bis zehn Testerpools hergestellt, in denen sich die Differenzierungsbasen der zugesetzten Fragmente unterschieden (2.9.1 und 2.9.2). Aus den Driver- und Testerpools wurden Fraktionen hergestellt und diese als Driver bzw. Tester in Subtraktionen eingesetzt (2.11).

### 2.9.4 Testsystem BCR-ABL und Testsystem GFPmut I

In den Testsystemen BCR-ABL und GFPmut I wurde die Konzentration der differentiellen Fragmente in den Testerpools in etwa der Konzentration angepasst, in der das BCR-ABL Bruchpunktfragment in Mse I-Repräsentationen von K562-Zellen vorliegt.

Dazu wurden Mse I-Repräsentationen von vier K562-Einzelnzellen (2.8) zu gleichen Teilen miteinander gemischt (K562-Zellpool) und daraus eine Verdünnungsreihe hergestellt. Es wurden ebenfalls Verdünnungsreihen der differentiellen Fragmente GFPmut I und BCR-ABL (2.9.2.1, 2.9.1.1) hergestellt. Anschließend wurde eine spezifische Kontroll-PCR mit den Primern K562-5'III und K562-3' und den Verdünnungsreihen des K562-Zellpools und der BCR-ABL Fragmente als Template durchgeführt (2.4.1). Es wurde ebenfalls eine spezifische Kontroll-PCR mit den Primern GFP-test 5' und 3' mit der Verdünnungsreihe des Fragments GFPmut I durchgeführt. Alle PCR-Produkte wurden dann in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt und die Verdünnungen bestimmt, die ausreichend Matrizen-Kopien enthielten, um eine sichtbare Bande auf dem Agarosegel zu erzeugen. Die PCR-Produkte einer 1:10<sup>5</sup> Verdünnung der BCR-ABL Fragmente und einer 1:10<sup>9</sup> Verdünnung der



GFPmut I Fragmente zeigten eine ähnliche Bande auf dem Gel. Eine ähnliche Bande erzeugte eine 1:10<sup>4</sup> Verdünnung des K562-Zellpools (Daten nicht gezeigt). Die differentiellen Fragmente wurden in der Weise in Testeransätze eingesetzt, dass ihre Konzentration einer 1:10<sup>5</sup> (BCR-ABL Fragmente) bzw. einer 1:10<sup>4</sup> Verdünnung (GFPmut I-Fragmente) entsprach.

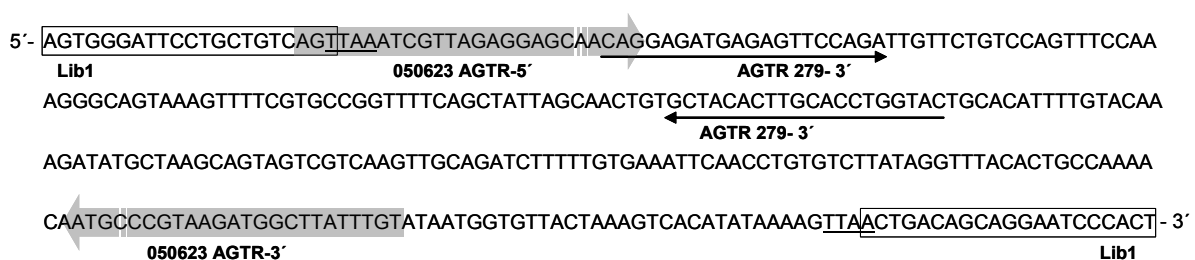
### 2.9.5 Testsystem GFPmut II

Um die Nachweisgrenze der Subtraktion zu ermitteln, wurde das differentielle Fragment GFPmut II in absteigenden Konzentrationen von jeweils einer Zehnerpotenz in Testeransätze eingesetzt. Dabei sollten die höchsten Konzentrationen in etwa dem 1000 - 5000fachen und die niedrigsten in etwa der einfachen Menge eines Mse I-Fragmentes aus einer einmalig vorkommenden Sequenz (z. B. einem *single copy* Gen) entsprechen. Zu diesem Zweck wurde zuerst eine absolute Quantifizierung eines Mse I-Fragmentes aus dem *single copy* Gen AGTR für eine Mse I-Repräsentation (Probe LP) vorgenommen und als Richtwert für alle normalen *single copy* Gensequenzen herangezogen. Die differentiellen Fragmente GFPmut II wurden dann in entsprechenden Konzentrationen in die Testeransätze eingebracht. Mittels relativer Quantifizierung wurden die Verhältnisse in den resultierenden Testeransätzen überprüft.

Konzentrationsbestimmungen wurden mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz durchgeführt (2.5.3). Absolute und relative Quantifizierungen wurden mittels quantitativer PCR (qPCR) in einem Lightcycler gemessen (2.4.4).

### 2.9.6 Absolute Quantifizierung eines humanen single copy Gens

Für die absolute Quantifizierung eines einzelnen Fragments in einer Mse I-Repräsentation wurde ein absoluter Standard für die qPCR hergestellt. Dazu wurde ein Mse I-Fragment aus dem humanen Gen AGTR isoliert und daraus eine Verdünnungsreihe zur Messung einer Standardkurve erstellt.



**Abb. 2** Mse I-Fragment aus AGTR. Das Fragment wurde mit dem Primerpaar 050623 AGTR angereichert und isoliert. Sein spezifischer Nachweis erfolgte mit Hilfe des Primerpaares AGTR-279 in einer spezifischen Kontroll-PCR oder einer quantitativen PCR (qPCR).

In einem 5fachen Ansatz spezifische Kontroll-PCR wurde mit dem Primerpaar 050623 AGTR (5': AGTTAAATCGTTAGAGGAGC, 3': ACAAATAAGCCATCTTACGG) ein Mse I-Fragment aus AGTR aus einer Mse I-Repräsentation von Normalzellen (LP) amplifiziert (Abb. 2). Das PCR-Produkt

wurde in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (2.5.1.1), extrahiert (2.5.2.1) und in 50 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Die PCR wurde mit einer 1:1000 Verdünnung dieses Eluats wiederholt, das PCR-Produkt ebenso aufgereinigt und in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Seine Konzentration wurde mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz bestimmt (66,7 ng/µl) und anschließend eine Verdünnungsreihe der Konzentrationen 6,67 pg/µl - 6,67 fg/µl hergestellt. Diese wurde als Standardkurve bei der Quantifizierung der Probe LP mit dem spezifischen Primerpaar „AGTR-279“ eingesetzt (5': CAGGAGATGAGAGTTCCAGA, 3': GTACCAGGTGCAAGTGTAGC). Durch eine *Crossing Point* Analyse (Lightcycler Software, Roche) konnte die Konzentration des *AGTR* Mse I-Fragmentes in der Probe LP aus dem Mittelwert von sechs Replikaten auf 38,85 fg/µl berechnet werden (Daten nicht gezeigt). Die Berechnung der Verdünnungsfaktoren für die GFPmut II Fragmente (vergleiche 2.9.2.1) zur Beimischung in die Testeransätze entsprechend eines *single copy* Mse I-Fragmentes wurde wie folgt vorgenommen:

$$[\text{GFPmut II}] : [\text{AGTR}_{\text{LP}}] = \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Beispiel: } 13603 \text{ ng/ml } [\text{GFPmut II-AA}] : 0,03885 \text{ ng/ml } [\text{AGTR}_{\text{LP}}] = 350141,57$$

Für Testeransätze mit einer Vielfachen-Konzentration an differentiellem Fragment wurden die Verdünnungsfaktoren gemäß

$$[\text{GFPmut II}] : [\text{AGTR}_{\text{LP}}] : x = \text{Verdünnungsfaktor}; x = \text{Vielfaches}$$

vorgenommen. Die Fragmente wurden schrittweise bis auf das 100fache der berechneten Faktoren verdünnt. Es wurde darauf geachtet, dass die Volumina nicht kleiner als 10 µl waren, um den Pipettierfehler gering zu halten. Zur Erstellung der Testerpools wurden diese Verdünnungen im Verhältnis 1:100 eingesetzt (2.9.3).

## 2.10 Arbeiten mit paramagnetischen Partikeln

In der vorliegenden Arbeit wurden Zielfragmente der Fraktionierung mittels paramagnetischer Partikel positiv selektiert. Nach erfolgter Bindung der Zielfragmente an die Partikel wurden diese mehrfach gewaschen, indem sie an der Wand eines Reaktionsgefäßes mit einem Magneten reversibel immobilisiert wurden und der Überstand abgenommen wurde. Zwischen den Waschschritten wurde das Reaktionsgefäß gewechselt; der Transfer der paramagnetischen Partikel erfolgte mittels Pipette. Es wurden Reaktionsgefäße benutzt, deren Oberfläche mit einer Anti-Haft-Beschichtung aus Silan überzogen war. Nach dem Waschen der Partikel wurde aus den gebundenen Fragmenten eine Fraktion hergestellt und mittels spezifischer Kontroll-PCR überprüft.

In dieser Arbeit wurde sowohl eine direkte Positivselektion von markierten DNA-Fragmenten als auch eine indirekte Positivselektion über markierte Adaptermoleküle verwendet. Bei der direkten Positivselektion wurden DNA-Fragmente mit markierten Oligonukleotidprimern amplifiziert und das PCR-Produkt dann mit paramagnetischen Partikeln inkubiert. Bei der indirekten Positivselektion (2.10.1) wurden paramagnetische Partikel mit markierten Oligonukleotid-Adaptoren inkubiert und die

Zielfragmente anschließend an die Adapter ligiert. Die Ligation der Zielfragmente erfolgte nach 2.3.2.2 (Tab. 2B).

### 2.10.1 Positivselektion durch PCR-Produkt-Kopplung

Je 20 µl Streptavidin-Partikel (Dyna) wurden zweimal in 2x Bindepuffer bzw. Anti-Digoxigenin-Partikel (Roche) in TEN<sub>100</sub> gewaschen. Anschließend wurden die Partikel im gleichen Puffer im Verhältnis 1:2 mit dem markierten PCR-Produkt gemischt und für 30 min auf einem Roller (Stuart Scientific) bei RT inkubiert. Dann wurde 1/5 Volumenanteil 0,1 M NaOH mit 0,5% Igepal zugegeben und für weitere 10 min rollend inkubiert. Anschließend wurde die Lösung von den Partikeln abgenommen und diese zweimal mit 0,1% Igepal in TE gewaschen und die Partikel dann im Reaktionsansatz der folgenden PCR aufgenommen.

### 2.10.2 Positivselektion durch Ligationskopplung

#### 2.10.2.1 Kopplung von markierten Oligonukleotid-Adaptoren

Paramagnetische Partikel mit Anti-Digoxigenin-Beschichtung und Streptavidinbeschichtung der Firma Roche (*Anti-Digoxigenin and Streptavidin Magnetic Particles*, 10 mg/ml) und paramagnetische Partikel mit Streptavidinbeschichtung der Firma Dynal (Dynabeads® M-280 Streptavidin, 10 mg/ml) wurden verwendet. Es wurden doppelsträngige Oligonukleotid-Adapter (2.3.1) mit einer 5'-Digoxigeninmarkierung bzw. einer 5'-Biotinmarkierung des langen Oligonukleotids zur Kopplung auf der Oberfläche der paramagnetischen Partikel eingesetzt.

Zur Kopplung der Bindungspartner wurden 10 - 40 µg Partikel (entsprach 10 – 40 µl Stocklösung) an einem Magneten immobilisiert, der Überstand abgenommen, die Partikel in ½ Volumen Pufferlösung aufgenommen und im Verhältnis 1:2 mit markierten Adaptern gemischt. Die Pufferlösung war für Dynal Streptavidin-Partikel ein 2 x Bindepuffer, für Roche Partikel der Waschpuffer TEN<sub>100</sub> (2.1.5). Die Inkubation erfolgte für 30 min auf einem Roller (Stuart Scientific) bei RT. Die nicht gebundenen Adaptermoleküle wurden danach in zwei Waschschritten abgetrennt: Dynal Streptavidin-Partikel wurden dazu in 1 x Bindepuffer + NP40, dann in 1 x Bindepuffer gewaschen und anschließend in 1 x Bindepuffer aufgenommen (2.1.5). Roche Partikel wurden dreimal in TEN<sub>100</sub> Waschpuffer gewaschen und in dem Puffer der nachfolgenden Reaktion zur Equilibrierung aufgenommen. Alle Puffer wurden bei 4°C gelagert.

Die benötigte Menge von paramagnetischen Partikeln für eine Positivselektion ergab sich aus ihrer Bindekapazität und der Anzahl von 5'-markierten Zielfragmenten. Die folgende Berechnung ist für 40 µg Partikel ausgelegt und stützt sich auf die Herstellerangaben für Roche Streptavidin- und Anti-Digoxigenin-Partikel, nach denen 1 mg Partikel 150 pmol Oligonukleotid binden:

=> 40 µg Partikel binden 6 pmol Oligonukleotid-Adapter;

sie werden im Verhältnis 1:2 mit Adaptern der Konzentration 16  $\mu\text{M}$  gemischt

=> 8  $\mu\text{M}$  liegen im Kopplungsansatz vor (= 8 pmol/ $\mu\text{l}$ );

das Endvolumen des Kopplungsansatzes sind 40  $\mu\text{l}$ .

=> 320 pmol Adapter sind im Kopplungsansatz enthalten.

Bei einer Bindekapazität von 6 pmol entspricht das einem Überschuss von  $\sim 50,3$  Adaptern zu einer Bindestelle auf der Oberfläche der Partikel. Dieses Verhältnis verschiebt sich bei der Benutzung von mehr bzw. weniger Partikeln entsprechend.

Die nachfolgende Berechnung zeigt auf, wie viele Oligonukleotid-Adapter für die Ligation der Proben-DNA zur Verfügung stehen. Sie basiert auf der Annahme, dass 6 pmol Oligonukleotid-Adapter an die Partikel gekoppelt sind, also alle Bindestellen besetzt wurden:

1 mol =  $6,022 \times 10^{23}$  Teilchen => 1 pmol =  $6,022 \times 10^{11}$  Teilchen;

=> 6 pmol entsprechen  $\sim 3,61 \times 10^{12}$  Adapter-Molekülen.

Im Verlauf der Etablierung wurden unterschiedliche Mengen Proben-DNA (250 bis 2000 ng, s. o.) in der Ligation an die Partikel/Adapter-Komplexe verwendet. Als Ausgangswert für die folgende Berechnung wurden 600 ng herangezogen. Aus der Masse für dsDNA von 91,5 ng/pmol folgt:

=> 600 ng Proben-DNA = 6,557 pmol oder  $\sim 3,95 \times 10^{12}$  Fragmente.

Da im Schnitt ein Viertel aller Fragment-Enden im Proben-Material ligationsfähig geschnitten sind (siehe Ergebnisse), handelt es sich um ein Verhältnis von  $3,61 \times 10^{12}$  Adapter-Molekülen zu  $9,87 \times 10^{11}$  DNA-Fragmenten. Dieses Verhältnis von 3,66:1 variierte in den Experimenten in Abhängigkeit von der eingesetzten Menge an Proben-DNA.

### 2.10.2.2 Waschprotokoll für paramagnetische Partikel

Nach einer Positivselektion durch Ligationskopplung sind die Zielfragmente für eine Fraktionierungs-PCR über die 5'-Markierung eines Adaptermoleküls auf der Oberfläche von paramagnetischen Partikeln gebunden. Um Primerbindestellen für die Fraktionierungs-PCR zu erhalten, müssen diese Fragmente in doppelsträngigem Zustand einer Auffüllreaktion unterzogen werden.

Streptavidin-Partikel von **Dynal** wurden mit Bedingungen gewaschen, unter denen die gebundenen Zielfragmente denaturiert wurden. Aus diesem Grund wurde die Auffüllreaktion der Adapter vor dem Waschen durchgeführt (2.3.3.2). Zwischen den Waschschritten wurden die Partikel jeweils am Magneten immobilisiert und der Überstand mit einer Pipette abgenommen. Die Waschschrritte wurden mit je 50  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem (50°C) Waschpuffer für 4 min in einem Heizblock bei 50°C vorgenommen (2.1.5). Zwischen den Waschschrritten wurde jeweils das Reaktionsgefäß (0,2 ml, silanisiert s. u.) gewechselt. Nacheinander wurde einmal mit WP<sub>150</sub> und zweimal mit WP<sub>250</sub>

gewaschen und die Partikel anschließend in WP<sub>2</sub> aufgenommen. Dann wurde der WP<sub>2</sub> durch den Reaktionsansatz der 1. Fraktionierungs-PCR ersetzt und die PCR gestartet.

Paramagnetische Partikel von **Roche** wurden unter nicht denaturierenden Bedingungen gewaschen, weshalb die Auffüllreaktion der Adapter nach dem Waschen als erster Schritt der folgenden Fraktionierungs-PCR durchgeführt wurde (2.3.3.1).

### 2.10.3 Silanisierung von PCR-Reaktionsgefäßen

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml Thermo-Tubes, Abgene) wurden mit einer Schicht aus Silan überzogen, um die Anheftung von DNA-Fragmenten an ihre Plastikoberfläche zu erschweren. Dazu wurde ein Glas-Exsikkator zu drei Vierteln mit geöffneten Reaktionsgefäßen gefüllt. In der Mitte des Exsikkators wurde ein Becherglas mit ca. 5 ml Dichlordimethylsilan (Merck) aufgestellt, der Exsikkator dicht verschlossen und ein Unterdruck angelegt. Über Nacht wurde der Unterdruck aufrechterhalten und die Reaktionsgefäße nach erfolgtem Verdampfen des Silans autoklaviert.

## 2.11 Subtraktion

Die hier durchgeführten Subtraktionsreaktionen wurden mit Änderungen nach Lisitsyn et. al durchgeführt (Lisitsyn, Lisitsyn et al. 1993), von denen eine ausführliche Beschreibung in *Current Protocols in Molecular Biology (CP) 25B.7, Basic Protocol 1* zu finden ist.

Nach einer Reamplifizierung der Tester- und Driver-Fractionen wurde das Testermaterial mit neuen Adaptersequenzen versehen. Dabei wurde in zwei aufeinander folgenden Depletionsrunden (Subtraktive Hybridisierung, SH) jeweils zwischen J21- und R21-Adaptoren gewechselt (1. und 3. SH: J21; 2. und 4. SH: R21). Das Produkt einer Depletionsrunde diente dabei als Tester in der jeweils folgenden Depletionsrunde. Die Mengenverhältnisse zwischen Tester und Driver wurden variiert und anschließend folgendermaßen festgelegt: Es wurden in der Regel 40 µg Driver mit 1000 ng Tester in der 1. SH, 400 ng Tester in der 2. SH, 50 ng Tester in der 3. SH und 500 pg in der 4. SH verwendet.

### 2.11.1 Subtraktive Hybridisierung

Zunächst wurden von der Testerfraktion fünf und von der Driverfraktion 40 Ansätze Reamp60 hergestellt (2.4.3.1, Tab. 10B), die Ansätze jeweils zusammengeführt, über je eine Microcon-Y30-Filtereinheit gegeben (nach den Angaben des Herstellers Amicon) und dann die Konzentration beider Proben gemessen. 8 µg Tester wurden mit 150 U Mse I inkubiert (2.2.1) und über eine *Wizard® SV PCR Clean-Up System*-Säule (Promega) nach Herstellerangaben gereinigt und die Konzentration des Eluats bestimmt. Die gewünschte Testermenge wurde mit J21- bzw. R21-Adaptoren in einer Standardligation für 6 – 15 h nach 2.3.2.1 ligiert. 40 µg Driver wurden mit 375 U Mse I inkubiert und anschließend bei 4°C verwahrt. Bei einem Subtraktionsprotokoll nach Felske (Felske 2002) wurde auf den Mse I-Verdau des Drivers verzichtet und dieser direkt nach der Reamplifikation verwendet.

Nach der Ligation wurde der Tester mit 25 - 40 µg Driver in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Es folgte eine Phenol/Chloroform-Extraktion und eine Fällung des Ansatzes (2.5.2.2 und 2.5.2.3). Das Pellet aus der Fällung des Tester/Driver-Gemisches wurde in 4 – 6 µl 3 x EE-Puffer in einem Blockthermostaten (BT1301, HLC) bei 37°C für ca. 5 min gelöst. Falls der Ansatz zu viskös war, wurde nochmals 1 µl 3 x EE-Puffer zugegeben. Die gelöste DNA wurde dann in ein 200 µl Reaktionsgefäß überführt, mit 40 µl PCR-Öl überschichtet und nochmals für 5 min bei 94°C denaturiert. Dann wurde die Probe auf 67°C abgekühlt, sofort mit 1 µl 5 M Natriumchlorid gemischt und anschließend für 16 – 20 h bei 67°C inkubiert. Zur Beendigung der Hybridisierungsreaktion wurden dem Ansatz bei 67°C 8 µl Hefe t-RNA (5 mg/ml, Roche) zugegeben, die Probe auf Eis gestellt und dann bis zu einem Gesamtvolumen von 80 µl mit TE (1x, pH 8,0) aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe mit der Pipette unter dem PCR-Öl abgesaugt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und auf 400 µl mit TE aufgefüllt.

### 2.11.2 Subtraktive PCR

Die subtraktiven PCR SUB1 und SUB2 wurden in einem MJ-Research durchgeführt. Die Reaktion SUB1 beinhaltete als ersten Protokollschrift eine Auffüllreaktion; die Reaktion SUB2 wurde mit einem *Hot Start* begonnen. Von einer Probe aus einer subtraktiven Hybridisierung wurden acht Ansätze SUB1 angefertigt, das Programm gestartet und nach 5 min Auffüllreaktion bei 68°C der PCR-Primer zugegeben. Das Produkt der SUB1 wurde über eine Microcon Y30-Säule nach Herstellerangaben gereinigt, in ca. 100 µl H<sub>2</sub>O eluiert und davon 50 µl einem MBN-Verdau zugeführt (2.2.3). Dessen Produkt wurde in vier Ansätze SUB2 eingesetzt, die mit einem *Hot Start* begonnen wurde, indem nach 1 min Denaturierung bei 94°C der Polymerase Mix bei 80°C zugeben wurde. Das Produkt der SUB2 (1. SH: DP-1, 2. SH: DP-2 usw.) wurde über eine Microcon Y30-Säule gereinigt und als Tester in die folgende Depletionsrunde eingesetzt.

**Tab. 23** Subtraktive PCR

	<b>SUB1</b>	<b>SUB2</b>
PCR-Puffer 1	5,0 [µl]	5,0 [µl]
Primer (100 µM)	0,5 [µl]	0,5 [µl]
dNTPs (10 mM)	2,0 [µl]	2,0 [µl]
Pol Mix (5 U/µl)	2,0 [µl]	0,5 [µl]*
Probe	20,0 [µl]	20,0 [µl]
H <sub>2</sub> O	21,0 [µl]	17,0 [µl]

\*: bei Hot Start 0,5 µl Pol Mix in 4,5 µl H<sub>2</sub>O während Zyklus 1, 80°C zugeben

**Tab. 24** Programme Subtraktive PCR

SUB1				
Temperatur	1 Zyklus	10 Zyklen	1 Zyklus	
94°C	—	30 s	—	
60°C	—	30 s	—	
68°C	5 min	2 min	10 min	
SUB2				
Temperatur	1 Zyklus	Temperatur	26 Zyklen	1 Zyklus
94°C	1 min	94°C	30 s	—
80°C*	30 s	60°C	30 s	—
		68°C	2 min	10 min

\*: bei Hot Start 0,5 µl Pol Mix in 4,5 µl H<sub>2</sub>O während Zyklus 1, 80°C zugeben

## 2.12 Elektronische Datenbankrecherche

Die Sequenzrecherche zur Erstellung von Oligonukleotidprimern und zur Identifizierung von Sequenzen wurde größtenteils mit den Suchmaschinen *NCBI Blast Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) und *USCS Human Genome Bioinformatics/Blat Search* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) durchgeführt und gegebenenfalls durch die Suchmaschine *Ensembl Human Genome Map View* ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/textview](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/textview)) ergänzt. Zur Analyse von Sequenzmotiven wurden die Programme MacDNASIS<sup>TM</sup> und CLUSTALW (*European Bioinformatics Institute*) verwendet.

## 2.13 Gesamtprotokoll zum experimentellen Vorgehen

### 2.13.1 Fraktionierung eines Genoms

#### 1) Reamplifizierung (2.4.3.1)

Eine 1:25 Verdünnung einer Mse I-Repräsentation in acht Ansätze Reamplifizierung einsetzen. Nach der PCR die Ansätze mischen und den PCR-Puffer mittels Microcon-Y30-Säule entfernen (nach Herstellerangaben).

Reaktionsansatz		Programm
Reamplifizierung		
5 µl	P1	
5 µl	Lib1 (10 µM)	
2 µl	dNTPs (10 mM)	
1,25 µl	BSA	
0,75 µl	Poymerase Mix	
35 µl	H <sub>2</sub> O	
1 µl	Probe	„SHORTRLP“

#### 2) Abtrennen der Lib1-Adapter (2.2.1)

Mse I-Verdau der Reamplifizierung. Nach dem Verdau Probe nach Herstellerangaben über Microcon-Y30-Säule reinigen; Konzentration bestimmen.

Mse I-Verdau		
anpassen	OPHA	
3 µl	Mse I (50 U)	
50-80 µl	Probe (gesamt)	
anpassen	H <sub>2</sub> O	Mse I-Verdau

#### 3) Annealing der J24n-Adapter (2.3.1)

Vorbereitung der Adapter J24An, J24Tn, J24Cn und J24Gn. Nach der Reaktion die vier Adapter zu gleichen Teilen mischen. Diesen J24-AGTCn Adapter-Mix aliquotieren und bei -20°C lagern.

Annealing J24n-Adapter		
1 µl	J24Nn (100 µM)	
1 µl	J12Nn (100 µM)	
1 µl	OPHA	
3 µl	H <sub>2</sub> O	Annealig-Rkt.

#### 4) Ligation der J24n-Adapter (2.3.2.2)

800 ng DNA aus 2) in silanisierten PCR-Reaktionsgefäßen ligieren.

Ligation J24n-Adapter		
10 µl	2x QL Puffer	
1 µl	Quick Ligase	
x µl	800 ng Probe	
2 µl	J24-AGTCn Mix	
Ad 20 µl	cum H <sub>2</sub> O	30' RT

#### 5) J20n-Amplifikation (2.4.3.2)

Pro Probe acht Ansätze J20n-Amplifikation. Nach der PCR die Ansätze mischen und den PCR-Puffer mittels Microcon-Y30-Säule (nach Herstellerangaben) abtrennen. Konzentration bestimmen.

J20n-Amplifikation		
2,5 µl	Probe	
5 µl	P1	
2 µl	dNTPs (10 mM)	
5 µl	J-20n (10 µM)	
1,25 µl	BSA	
1 µl	Taq Polymerase	
33,25 µl	H <sub>2</sub> O	„J20n-PCR“

#### 6) 1. Fraktionierungsverdau (2.2.2)

Je einen Restriktionsverdau des J20n-PCR-Produkts mit den Enzymen Dra I, Vsp I, Ksp AI und Bsp TI ansetzen. Danach jeweils mit Wizard® SV PCR Clean-Up System nach Herstellerangaben aufreinigen, Konzentration des Eluats bestimmen.

1. Fraktionierungsverdau		
20 µl	Puffer	
15 µl	Enzym	
x µl	ca. 10 µg Probe	
Ad 200 µl	cum H <sub>2</sub> O	Frakt.verdau

#### 7) Annealing der (bio-)26Rn-Adapter (2.3.1)

Vorbereitung der Adapter. Nach der Reaktion aliquotieren und bei -20°C lagern.

Annealing bio-26Rn		
10 µl	bio-R26Nn (100 µM)	
10 µl	R13Nn (100 µM)	
10 µl	OPHA	
30 µl	H <sub>2</sub> O	Annealig-Rkt.
bzw:		
Annealing 26Rn		
30 µl	R26Nn (100 µM)	
30 µl	R13Nn (100 µM)	Annealig-Rkt.



## Einfache Fraktionierung

- 8) Ligationskopplung: Vorbereitung (2.10.2.1)  
Streptavidin Partikel (Dyna) 2x mit 50 µl 2xBP waschen, in 20 µl 2xBP in silanisierten Reaktionsgefäßen aufnehmen. Biotinylierte Adapter aus 7) zugeben, rollend inkubieren, dann 1x in BP+NP40 und 1x in BP waschen, in WP2 aufnehmen.

Reaktionsansatz		Programm
Vorbereitung der Partikel		
40 µl	Partikel	
20 µl	bio-26RNn	1h RT
einzusetzen wie folgt:		
Enzym	Adapter	
Dra I	bio-26RAn	
Vsp I	bio-26RTn	
Ksp AI	bio-26RCn	
Bsp TI	bio-26RGn	

- 9) Ligationskopplung der Fragmente (2.10.2.1)  
Pro Fraktion je ca. 600 ng DNA aus 6) mit den Partikeln rollend inkubieren. Silanierte Reaktionsgefäße verwenden. Anschließend die Partikel in 50 µl WP1 waschen und in 50 µl WP2 aufnehmen.

Ligationskopplung		
20 µl	2x QL Puffer	
2 µl	Quick Ligase	
x	Probe	
Ad 40 µl	Partikel in H <sub>2</sub> O	1h RT

- 10) Auffüllreaktion (2.3.3.2)  
WP2 abnehmen, Partikel sorgfältig mit dem Reaktionsansatz mischen und 5 min bei 68°C inkubieren.

Auffüllreaktion		
5 µl	P1	
2 µl	dNTPs (10 mM)	
1,25 µl	BSA	
1 µl	Taq Polymerase	
40,75 µl	Partikel in H <sub>2</sub> O	5' bei 68°C

- 11) Waschen der Partikel (2.10.2.2)  
Alle Waschpuffer auf 50°C vorwärmen, Waschschritte für je 4 min bei 50°C durchführen. Zwischen den Schritten Reaktionsgefäße (silanisiert) wechseln, zuletzt in WP2 aufnehmen.

Waschen der Partikel		
50 µl	WP <sub>1</sub> 50	1x Waschen
50 µl	WP <sub>2</sub> 50	2x Waschen
In 50 µl	WP2	aufnehmen

- 14) 1. Fraktionierungs-PCR (2.4.2.2.1)  
Partikel immobilisieren, WP2 abnehmen, Reaktionsansatz zugeben und sorgfältig mischen. Nach der Reaktion das PCR-Produkt mittels Wizard® SV PCR Clean-Up System nach Herstellerangaben reinigen, in 40 µl H<sub>2</sub>O eluieren.

1. Fraktionierungs-PCR		
5 µl	P1	
5 µl	23R'm (8 µM)	
2 µl	dNTPs (10 mM)	
1,25 µl	BSA	
1 µl	Polymerase Mix	
35,75 µl	H <sub>2</sub> O	„1.PCR-EF/GF“

- 15) MBN-Verdau (2.2.3)  
Die Probe nach dem Verdau mit 160 µl Tris pH 8,9 auffüllen und durch Hitze inaktivieren.

MBN-Verdau		
4 µl	MBN Puffer	
2 µl	MBN	
34 µl	Probe	MBN-Verdau
160 µl	Tris pH 8,9	5' 98°C

- 16) 2. Fraktionierungs-PCR (2.4.2.2.1)

- 17) Spezifische Kontroll-PCR (2.4.1)  
0,5 µl einer 1:10 Verdünnung der 2. Fraktionierungs-PCR in die spezifische Kontroll-PCR einsetzen.

2. Fraktionierungs-PCR		
5 µl	P1	
5 µl	23R'm (8 µM)	
2 µl	dNTPs (10 mM)	
1,25 µl	BSA	
1 µl	Polymerase Mix	
20 µl	Probe	
15,75 µl	H <sub>2</sub> O	„2.PCR-EF/GF“

## Gemischte Fraktionierung

- 8) Ligation nicht biotinylierter Adapter (2.3.2.1)  
Ca. 4 µg DNA aus 6) mit 26RNn-Adapter aus 7) inkubieren (z. B. über Nacht).
- 9) Auffüllreaktion (2.3.3.1)  
Reaktionsansatz zu Probe zugeben, dann auf vier Reaktionsgefäße à 100 µl aufteilen. Nach der Reaktion die Ansätze mischen und über eine Microcon-Y30-Säule nach Herstellerangaben reinigen.
- 10) 2. Fraktionierungsverdau (2.2.2)  
Gesamtes Eluat einsetzen. Nach der Reaktion mit *Wizard® SV PCR Clean-Up System* nach Herstellerangaben reinigen, Konzentration des Eluats bestimmen.
- 12) Ligationskopplung:  
Vorbereiten der Partikel (nach Herstellerangaben)  
Streptavidin Partikel (Roche) 2x mit TEN<sub>100</sub> waschen. In silanisierte Reaktionsgefäße aufnehmen. Biotinylierte Adapter aus 7) zugeben, rollend inkubieren, dann 2x in TEN<sub>1000</sub> waschen, in 50 µl WP2 aufnehmen.
- 13) Ligationskopplung der Fragmente (2.10.2)  
Pro Fraktion ca. 1250 ng DNA aus 10) mit den Partikeln rollend inkubieren. Silanisierte Reaktionsgefäße verwenden. Anschließend die Partikel waschen und in 50 µl WP2 aufnehmen.
- 14) Waschen der Partikel (nach Herstellerangaben)  
Es erfolgt keine Auffüllreaktion. Waschschritte für je 4 min bei RT durchführen. Zwischen den Schritten Reaktionsgefäße (silanisiert) wechseln, zuletzt in WP2 aufnehmen.
- 11) 1. Fraktionierungs-PCR (2.4.2.2.2)  
WP2 abnehmen und PCR-Mix zugeben, Hot Start durchführen: Nach 1 min bei 94°C die Polymerase bei 80°C zugeben, PCR-Programm durchführen. PCR-Produkt nach der Reaktion sorgfältig von den Partikeln abnehmen, in neues Reaktionsgefäß überführen.
- 12) 2. Fraktionierungs-PCR (2.4.2.2.2)
- 13) Spezifische Kontroll-PCR  
0,5 µl einer 1:10 Verdünnung der 2. Fraktionierungs-PCR in die spezifische Kontroll-PCR einsetzen.

Reaktionsansatz		Programm
Standardligation		
10 µl	OPHA Puffer	
10 µl	T4 Ligase	
10 µl	ATP (10 mM)	
x µl	Probe	
40 µl	26RNn (50 µM)	
Ad 100 µl	cum H <sub>2</sub> O	10-12 h, 15°C
Auffüllreaktion		
40 µl	P1	
16 µl	dNTPs (10 mM)	
10 µl	BSA	
6 µl	Taq Polymerase	
100 µl	Probe	
228 µl	H <sub>2</sub> O	3' bei 68°C
2. Fraktionierungsverdau		
10 µl	Puffer	
6 µl	Enzym	
x µl	ca. 5 µg Probe	
Ad 100 µl	cum H <sub>2</sub> O	Frakt.verdau
Vorbereitung der Partikel		
35 µl	Partikel	2x Waschen aufnehmen zugeben 30' RT
In 50 µl	TEN <sub>100</sub>	
In 50 µl	TEN <sub>100</sub>	
20 µl	bio-26RN	
50 µl	TEN <sub>1000</sub>	2x Waschen
in 50 µl	WP2	aufnehmen
Ligationskopplung		
20 µl	2x QL Puffer	
2 µl	Quick Ligase	
x	Probe	
Ad 40 µl	Partikel in H <sub>2</sub> O	1h RT
Waschen der Partikel		
	Ligationsmix	abnehmen
In 50 µl	TEN <sub>1000</sub>	3x Waschen
in 50 µl	WP2	aufnehmen
1. Fraktionierungs-PCR		
5,0	PCR-Puffer 1	„1. PCR-GF Hot“
5,0	23R'Nn1 (8 µM)	
5,0	23R'Nn2 (8 µM)	
2,0	dNTPs (10 mM)	
1,25	BSA	
26,75	Partikel in H <sub>2</sub> O	
1,0	Polymerase Mix	
in 4 µl H <sub>2</sub> O	zugeben	
2. Fraktionierungs-PCR		
5,0	PCR-Puffer 1	
5,0	23R'Nn1 (8 µM)	
5,0	23R'Nn2 (8 µM)	
2,0	dNTPs (10 mM)	
1,25	BSA	
5,0	Probe (1. PCR)	
1,0	Polymerase Mix	"2. PCR- EF/GF"
25,75	H <sub>2</sub> O	

## 2.13.2 Subtraktion von fraktionierten Genomen

### 1) Reamplifizierung der Fraktionen (2.4.3.1)

5fachen Ansatz des Testers und 40fachen Ansatz des Drivers mit den jeweiligen Fraktionierungsprimern vorbereiten, 1:10 Verdünnung der Fraktionen einsetzen. Nach der PCR die Ansätze des Testers mischen, je 5 Ansätze des Drivers mischen. Jeweils über Microcon-Y30-Säule reinigen, Driver-Eluate mischen, Konzentration bestimmen.

### 2) Mse I-Verdau (2.2.3)

Ca. 8 µg Tester und 40 µg Driver einsetzen. Nach der Reaktion Tester über Wizard® SV PCR Clean-Up System reinigen; Konzentrationsbestimmung.

### 3) Ligation J21- bzw. R21-Adapter (2.3.2.1)

In den Depletionsrunden J21 und R21 im Wechsel verwenden. Tester-Menge: 1. SH: 1000 ng, 2. SH: 400 ng, 3. SH: 50 ng (4. SH: 500 pg).

### 4) Phenol-Chloroform Extraktion (2.5.2.2)

Tester aus 3) mit Driver aus 2) in einem Reaktionsgefäß (1,5 ml) mischen, mit H<sub>2</sub>O auffüllen. Extraktion durchführen, Überstand in neues Reaktionsgefäß überführen.

### 5) Fällung der Probe (2.5.2.3)

Probe mit Ammoniumchlorid und anschließend mit Ethanol mischen, über Nacht fällen, dann pelletieren und Waschen.

### 6) Subtraktive Hybridisierung (2.11.1)

Pellet in 3xEE Puffer lösen (evt. 5 min bei 37°C inkubieren), in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß mit PCR-Öl überschichten. 5 min bei 95°C denaturieren, auf 67°C abkühlen und direkt Natriumchlorid zugeben. Mindestens 16 h inkubieren. Hybridisierung durch Zugabe von Hefe t-RNA und TE stoppen. 80 µl Probe ohne PCR-Öl mit PCR-H<sub>2</sub>O auffüllen.

### 7) Testerspezifische Anreicherung: SUB1 (2.11.2)

Acht Reaktionsansätze SUB1 ansetzen, nach der Auffüllreaktion Oligonukleotidprimer zugeben. Nach der PCR Ansätze mischen und über Microcon-Y30-Säule aufreinigen.

### 8) MBN-Verdau (2.2.3)

Probe nach dem Verdau mit Tris pH 8,9 auffüllen, dann Enzym inaktivieren.

### 9) Testerspezifische Anreicherung: SUB2 (2.11.2)

Acht Reaktionsansätze SUB2 ansetzen. Hot Start: bei 80°C Polymerase zugeben. Nach der PCR Ansätze mischen und über Microcon-Y30-Säule aufreinigen. Das Produkt ist DP-1 (DP-2, DP-3, DP-4 respektive).

Reaktionsansatz		Programm
Reamplifizierung		
5 µl	PCR-Puffer P1	
10 µl	Primer (10 µM)	
2,5 µl	dNTPs (10 mM)	
1,25 µl	BSA	
0,75 µl	Polymerase Mix	
1 µl	Probe	
38 µl	H <sub>2</sub> O	„Reamp60“
Mse I-Verdau		
Tester	Driver	
4 µl	10 µl	OPHA
3 µl	7,5 µl	Mse I
x µl	x µl	Probe
ad 40 µl	ad 100 µl	cum H <sub>2</sub> O
		Mse I-Verd.
Standardligation		
2 µl	OPHA	
2 µl	T4-DNA-Ligase	
2 µl	Adapter (50 µM)	
2 µl	ATP (100 µM)	
x µl	Probe	
ad 20 µl	cum H <sub>2</sub> O	12h, 15°C
Phenol-Chloroform Extraktion		
20 µl	Tester	
40 µg	Driver	
ad 400 µl	cum H <sub>2</sub> O	
1x 400 µl	Phenol/Chloroform	
2x 400 µl	Chloroform	
Fällung		
x µl	Probe	
1/5 Volumen	10 M NH <sub>4</sub> Cl	
2,25% (v/v)	99% Ethanol	-20°C ü. N.
Subtraktive Hybridisierung		
4-6 µl	3xEE Puffer	
40 µl	PCR-Öl	5 min 95°C
1 µl	5 M NaCl	67°C 16 h
8 µl	t-RNA 5 µg/µl in TE	
67 µl	1xTE	
320 µl	H <sub>2</sub> O	zugeben
SUB1		
5 µl	PCR-Puffer P1	
2 µl	dNTPs 10mM	
0,5 µl	Polymerase Mix	
22 µl	H <sub>2</sub> O	
20 µl	Probe	5 min 68°C
0,5 µl	J21 (R21) 100 µM	„SUB1“
MBN-Verdau		
50 µl	Probe	
6 µl	MBN-Puffer	
4 µl	MBN	MBN-Verd.
160 µl	Tris pH 8,9	5 min 98°C
SUB2		
5 µl	PCR-Puffer P1	
2 µl	dNTPs 10mM	
0,5 µl	J21 (R21) 100 µM	
17,5 µl	H <sub>2</sub> O	
20 µl	Probe	1 min 94°C
0,5 µl (in 4,5 µl)	Pol Mix in H <sub>2</sub> O	„SUB2“

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Methode zur Identifizierung von chromosomalen Bruchpunkten in Tumorzellen in Anlehnung an die Repräsentations-Differenzanalyse (*Representational Difference Analysis, RDA*) etabliert (Lisitsyn, Lisitsyn et al. 1993).

Die RDA ermöglicht die selektive Anreicherung von Zielsequenzen (differentielle Fragmente), die in einem Gemisch von Restriktionsenzymfragmenten (Tester), jedoch nicht in einem Vergleichsgemisch (Driver) vorhanden sind, durch eine subtraktive Hybridisierung. Für dieses Vorgehen, bei dem Tester- und Driverfragmente miteinander hybridisieren, eignet sich lediglich fragmentierte DNA begrenzter Sequenzvielfalt. Die Entwickler der RDA verwendeten deshalb Repräsentationen aus Tester- und Drivergenomen, die durch Restriktionsverdau und anschließende PCR-Amplifikation gewonnen wurden. Durch diese Schritte konnten sie die Sequenzvielfalt von humanen Genomen reduzieren.

Für die Identifizierung von Translokationsbruchpunkten sollte DNA aus humanen Tumorzellen als Tester und aus humanen Normalzellen als Driver eingesetzt werden. Zur Etablierung der Methode wurden anstatt von DNA aus Tumorzellen verschiedene Tester-DNA-Gemische („Testerpools“) verwendet. Sie unterschieden sich von einem Driver-DNA-Gemisch aus humaner Lymphozyten-DNA („Driverpool“) nur durch die Zugabe eines humanen Translokationsfragments bzw. eines nicht humanen Fragments.

Der erste Teil der Methodenetablierung beschreibt die Reduktion der Sequenzvielfalt dieser Tester- und Driverpools: Mit Hilfe der so genannten Fraktionierung wurden die genomischen Restriktionsenzymfragmente in definierte Gruppen - Fraktionen - aufgeteilt. Die zweite Hälfte des vorliegenden Ergebnisteils beschreibt die subtraktive Hybridisierung dieser Fraktionen.

#### 3.1 Einführung in die Fraktionierung

Um subtraktive Hybridisierungen von komplexen Genomen durchführen zu können, reduzierten Lisitsyn et al. deren Sequenzkomplexität, indem sie Repräsentationen verwendeten. Zu ihrer Herstellung wurden die Genome durch Restriktionsenzyme mit sechsstelligen Erkennungssequenzen verdaut und mit PCR-Adaptoren ligiert. In der darauf folgenden PCR wurden nur kleine Restriktionsfragmente amplifiziert, der Großteil der Sequenzen jedoch eliminiert, wodurch eine Reduktion der genomischen Komplexität auf etwa zehn Prozent erreicht werden konnte.

In der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung von chromosomalen Bruchpunkten diente genomische DNA als Ausgangsmaterial, die mittels Mse I-Adapter PCR global amplifiziert worden war (Klein, Schmidt-Kittler et al. 1999; Klein, Blankenstein et al. 2002). Die Erkennungssequenz TTAA von Mse I kommt im Verhältnis zu den von Lisitsyn verwendeten Enzymen sehr viel häufiger vor, weshalb in einer Mse I-Repräsentation Fragmente vorliegen, die im Durchschnitt ca. 300 bp lang sind. Dieser Sequenzpool sollte so aufbereitet werden, dass geeignete Tester und Driver entstehen, die die gesamte Information des Genoms für die Subtraktion zugänglich machen. Daher wurden Mse I-

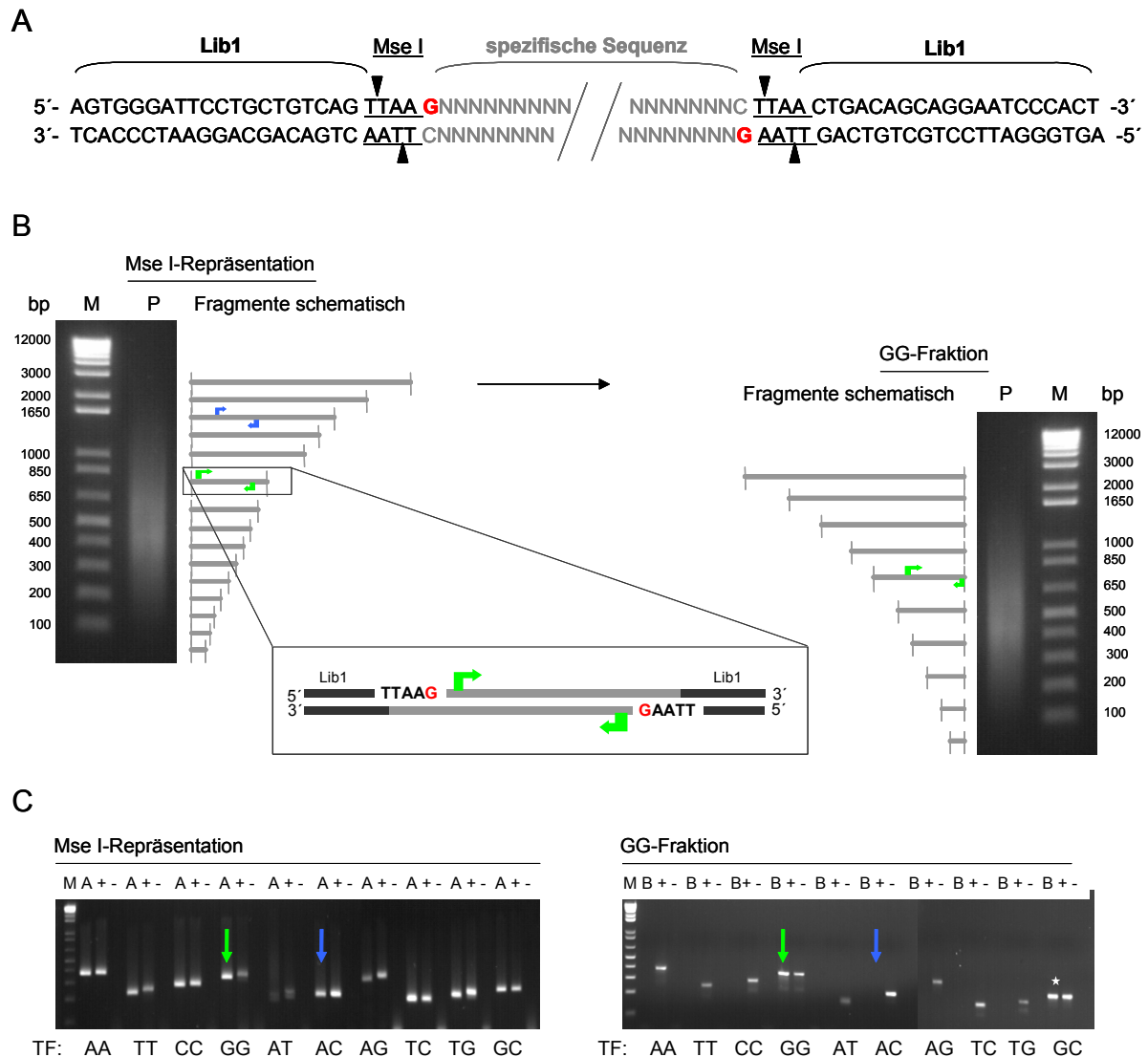
Repräsentationen durch eine so genannte Fraktionierung in zehn Anteile („Fraktionen“) aufgeteilt. Um durch die Fraktionierung keinen Informationsverlust zu generieren, sollte die Diversität einer genomischen Repräsentation von den Fraktionen zusammen genau wiedergeben werden. Jedes Sequenzfragment wurde daher unabhängig von seiner Lokalisation im Genom, seiner Funktion oder der Länge seiner DNA-Sequenz eindeutig einer Fraktion zuordnet.

### 3.1.1 Die Einteilung der Fraktionen: Differenzierungsbasen

In einer Mse I-Repräsentation tragen alle Fragmente die 21 Basenpaare lange Adaptersequenz Lib1 an den Enden und gleichen sich daher inklusive der Mse I-Schnittstelle auf einer Länge von 24 Basenpaaren. Die individuelle Sequenz, durch die sich ein Fragment von den anderen unterscheidet, beginnt erst mit der nachfolgenden Nukleobase. Diese wird im Folgenden als Differenzierungsbase bezeichnet. Den genauen Aufbau eines doppelsträngigen Mse I-Fragments mit Lib1-Adapter und Differenzierungsbasen erläutert Abb. 3A. Die Kombination der Differenzierungsbasen von beiden Fragmentenden bestimmte die Zugehörigkeit eines Mse I-Fragmentes zu einer Fraktion. Die Fraktionen wurden nach ihren Differenzierungsbasen aus Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G) benannt und in vier Einfache Fraktionen AA, TT, CC, GG und sechs Gemischte Fraktionen AT, AC, AG, TC, TG, GC eingeteilt.

Ginge man davon aus, dass die Verteilung von Differenzierungsbasen im Genom ausgewogen ist, umfasste jede Fraktion etwa zehn Prozent des Genoms. Bei einer durchschnittlichen Mse I-Fragmentlänge von 300 Basenpaaren und einer Anzahl von etwa drei Milliarden Basenpaaren im humanen Genom würde eine Mse I-Repräsentation ca. zehn Millionen verschiedene Sequenzen umfassen, so dass für jede Fraktion etwa eine Million unterschiedliche Sequenzen selektiert würden.

Abb. 3B und C verdeutlichen die Charakteristika einer Mse I-Repräsentation und einer aus ihr gewonnenen Fraktion am Beispiel einer GG-Fraktion. Während bezüglich der Bandbreite an Fragmentlängen zwischen Mse I-Repräsentation und Fraktion kein Unterschied erkennbar sein sollte (Abb. 3B), macht ein spezifischer Nachweis von ausgewählten Fragmenten (Testfragmente) hingegen den Unterschied zwischen beiden Proben deutlich (Abb. 3C). In der Mse I-Repräsentation sind Testfragmente aus allen Fraktionen spezifisch nachweisbar, wohingegen in der GG-Fraktion nur Fragmente mit den Differenzierungsbasen GG enthalten sind. Im Falle einer ungenügenden Fraktionierung treten in der Fraktion auch Fragmente mit anderen Differenzierungsbasen auf, wie z. B. ein GC-Fragment in der gezeigten GG-Fraktion (Abb. 3C, \*).



**Abb. 3** Schema zur Fraktionierung am Beispiel einer GG-Fraktion. **(A)** Die Differenzierungsbasen eines Mse I-Fragmentes bestimmen seine Fraktionszugehörigkeit: Mse I-Fragment mit Lib1-Adaptoren, Mse I-Schnittstellen (unterstrichen) und Differenzierungsbasen (rot). **(B)** Fragmentlängenverteilung in einer Mse I-Repräsentation und einer GG-Fraktion. Grüne Pfeile: Spezifische Primer für Testfragment mit GG-Differenzierungsbasen (rot). Blaue Pfeile: Spezifische Primer für Testfragment mit anderen Differenzierungsbasen. **(C)** Spezifischer Nachweis von Testfragmenten (TF) mit den angegebenen Differenzierungsbasen. (M: Längenstandard, A: Mse I-Repräsentation, B: GG-Fraktion, +/-: Positivkontrolle/Negativkontrolle. Grüne Pfeile: Nachweis eines GG-Testfragments; Blaue Pfeile: Nachweis eines anderen Testfragments (Beispiel AC-Fragment), \*: Nachweis eines unerwünschten GC-Testfragments in der GG-Fraktion)

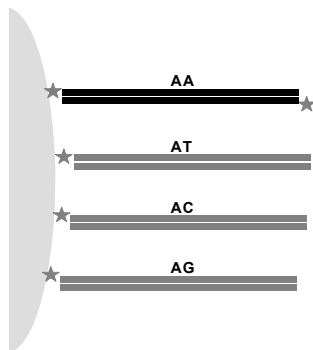
### 3.1.2 Grundmechanismen der Fraktionierung

Der Fraktionierung eines Genoms lagen zwei Mechanismen zu Grunde: (1) Eine Fraktion wurde durch selektive Anreicherung aus der Gesamtheit aller Mse I-Fragmente gebildet. (2) Gleichzeitig erfolgte die Abreicherung der anderen Fraktionen.

Die gewünschten Fragmente wurden mittels Polymerase Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) durch aufeinander aufbauende Reaktionen sukzessive angereichert. Eine erste Herangehensweise nutzte dabei die Sequenz Lib1 als Primerbindestelle, für die fraktionsspezifische

Oligonukleotidprimer entwickelt wurden (3.5). Die Versuche zu diesem Fraktionierungsprotokoll wurden an das Ende des Ergebnisteils gestellt, denn es lieferte letztlich keine zufrieden stellende Fraktionierung. Die gewonnenen Erkenntnisse über die Manipulierbarkeit von komplexen PCR-Produkten und die Bedeutung von exakt eingestellten PCR-Bedingungen waren jedoch eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg einer zweiten Strategie zur selektiven Anreicherung der Fraktionen. Diese zielte auf die Schaffung fraktionsspezifischer Primerbindestellen, die nicht mit der Sequenz Lib1 verwandt waren (3.2).

Ein Bestandteil beider Strategien war die Positivselektion von Fragmenten in Abhängigkeit einer Differenzierungsbase. Bei der Positivselektion wurden Fragmente, welche eine der vier Differenzierungsbasen an einem Ende oder beiden Enden trugen, z. B. mit einem Biotin-Molekül markiert und über dessen Wechselwirkung mit einem Streptavidin-Molekül auf der Oberfläche von paramagnetischen Partikeln gebunden. Über jede der vier Differenzierungsbasen wurden eine Einfache Fraktion und drei Gemischten Fraktionen selektiert, beispielsweise über die Differenzierungsbase A die Einfache Fraktion AA und die Gemischten Fraktionen AT, AC und AG (Abb. 4). Durch das Waschen der Partikel nach der Positivselektion konnten von neun unerwünschten Fraktionen sechs entfernt werden. Von den verbleibenden vier Fraktionen wurde jeweils nur eine ausgewählt, die im weiteren Verlauf unter anderem mit Hilfe von individuellen PCR-Primern angereichert wurde.



**Abb. 4** Schema der Positivselektion von Fragmenten an paramagnetischen Partikeln in Abhängigkeit der Differenzierungsbase A: AN-Fragmente werden hier über eine Biotin/Streptavidin-Wechselwirkung auf der Oberfläche von paramagnetischen Partikeln gebunden (hellgrau: Partikel, schwarz: Einfache Fraktion AA, grau: Gemischte Fraktionen AT, AC und AG, \*: Biotin-Streptavidin-Komplex).

### 3.1.3 Kontrolle des Fraktionierungserfolges

Zur Evaluierung eines Fraktionierungsprotokolls wurde die Fragmentzusammensetzung in den resultierenden Fraktionen analysiert. Zum einen wurde die Verteilung der Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese mit einem Längenstandard verglichen. Zum anderen wurden definierte Mse I-Fragmente in den Fraktionen spezifisch nachgewiesen. Hierzu wurden mit Hilfe einer Datenbankrecherche und eines virtuellen Mse I-Restriktionsverdaus (Programm MacDNASIS™) aus einmalig vorkommenden Gensequenzen 85 Mse I-Fragmente mit bekannten Differenzierungsbasen

ausgewählt, die zwischen 128 und 1936 bp lang waren („Testfragmente“, siehe 7.2.3). Der Nachweis der Testfragmente wurde mittels sequenzspezifischer Oligonukleotidprimer in einem PCR-Verfahren durchgeführt („spezifische Kontroll-PCR“, 2.4.1). Als Kontroll-Population dienten unfractionierte Mse I-Repräsentationen aus DNA von Normalzellen<sup>1</sup>. Die Produkte der spezifischen Kontroll-PCR wurden in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt.

Eine Fraktion wurde als „positiv“ bezeichnet, wenn Testfragmente mit den gewünschten Differenzierungsbasen zwischen 200 und 1000 Basenpaaren (bp) Länge nachgewiesen werden konnten. Eine Fraktion wurde als „unvollständig“ bzw. „negativ“ bezeichnet, wenn eines bzw. mehrere der gewünschten Testfragmente nicht nachgewiesen wurden. Der Begriff „nicht rein“ bezeichnete eine Fraktion, die nachweisbar Fragmente mit falschen Differenzierungsbasen enthielt. Die Maßgabe zur Etablierung eines Fraktionierungsprotokolls war die Herstellung von zehn positiven und reinen Fraktionen.

### 3.1.3.1 Nachweisgrenze der Kontroll-PCR

Die Hauptanforderung an die spezifische Kontroll-PCR war eine hohe Sensitivität, so dass auch Testfragmente, die in nur wenigen Kopien in einer Fraktion vorkamen, in Form von sichtbaren Banden auf einem Agarosegel nachgewiesen werden konnten. Daher wurde die spezifische Kontroll-PCR erst mit dem Beginn ihrer Plateau-Phase beendet. Es handelte es sich also um einen qualitativen Nachweis, der keine präzise Information über die relative Häufigkeit eines nachgewiesenen Fragmentes lieferte.

Es sollte festgestellt werden, ob mit der spezifischen Kontroll-PCR bis zu zwei Kopien eines Fragmentes nachgewiesen werden konnten. Zunächst wurde die Zyklenzahl bestimmt, in dem eine spezifische Kontroll-PCR die Plateau-Phase erreicht<sup>2</sup>. Nach 30, 32, 34, 36, 38 und 40 Zyklen des PCR-Programms BP58 (2.4.1) wurde die Bandenstärke der Testfragmente Ex 8/9 AA, D16S3019 und abl-CC auf einem analytischen Agarosegel kontrolliert (Abb. 5A). Für jede Anzahl von Zyklen wurde mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz die Konzentration der PCR-Produkte gemessen (Tab. 25). Eine Abnahme von doppelsträngigem PCR-Produkt in späten Zyklen einer PCR korreliert mit dem Erreichen der Plateauphase, in der hauptsächlich Einzelstrang-DNA gebildet wird, da der Fluoreszenzfarbstoff nur in doppelsträngige DNA interkaliert. Die Testfragmente D16S3019 und abl-CC zeigten ab dem 38. Zyklus eine Abnahme von doppelsträngigem PCR-Produkt.

---

<sup>1</sup> Es wurden je sechs CD3+ und CD19+ Lymphozyten (Färbung mittels direkt markierter Antikörper) von Haft-Objektträgern per Mikromanipulation isoliert, ihre Mse I-Repräsentationen angefertigt und diese dann zu gleichen Teilen gemischt.

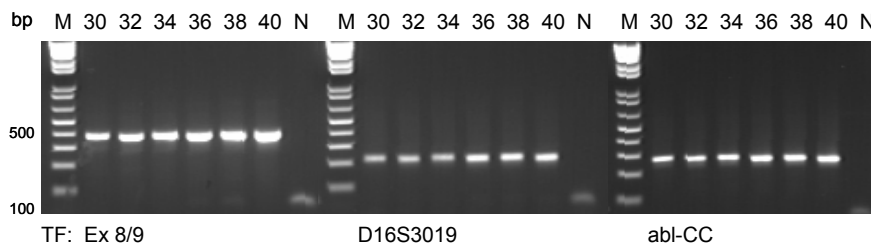
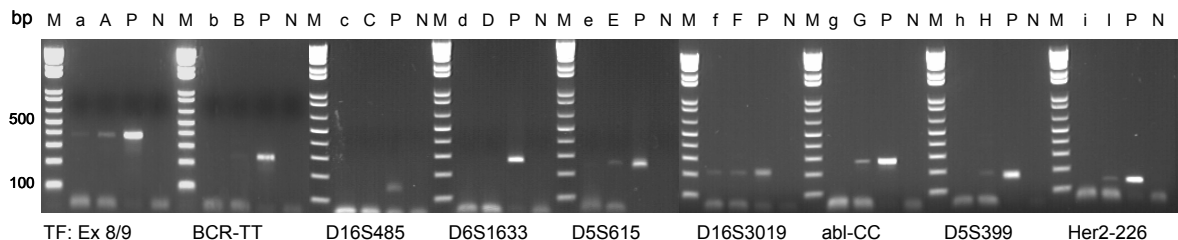
<sup>2</sup> Ein 5fach Ansatz spezifische Kontroll-PCR wurde mit einer 1:25 Verdünnung einer Mse I-Repräsentation als Template durchgeführt (Programm BP58). Jeweils 5 µl wurden in den Zyklen 30, 32, 34, 46, 38 und 40 nach Beendigung der Elongation entnommen, auf Eis verwahrt, je 4 µl in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt und 1 µl in die Konzentrationsmessung eingesetzt.



**Tab. 25** Konzentration spezifischer PCR-Produkte bei steigenden Zyklenzahlen [ng/μl]

Zyklen	30	32	34	36	38	40	N*
Ex 8/9 AA	37,39	48,54	56,86	83,57	83,78	95,87	7,35
D16S3019	12,48	15,01	15,41	19,14	21,51	18,30	5,35
abl-CC	21,74	26,47	27,35	34,68	44,48	37,17	5,03

\*: Negativkontrolle nach 40 Zyklen

**A****B****Abb. 5** Charakteristika der spezifischen Kontroll-PCR (**A**) Bandenstärke von Testfragmenten (TF) bei steigenden Zyklenzahlen (M: Marker, 30 – 40: Zyklenzahl, N: Negativkontrolle nach 40 Zyklen) (**B**) Nachweisgrenze von Testfragmenten bei 38 Zyklen (a – i: DNA von einer Zelle, A – I: DNA von zwei Zellen, P: Positivkontrolle Mse I-Repräsentation, N: Negativkontrolle nach 38 Zyklen)

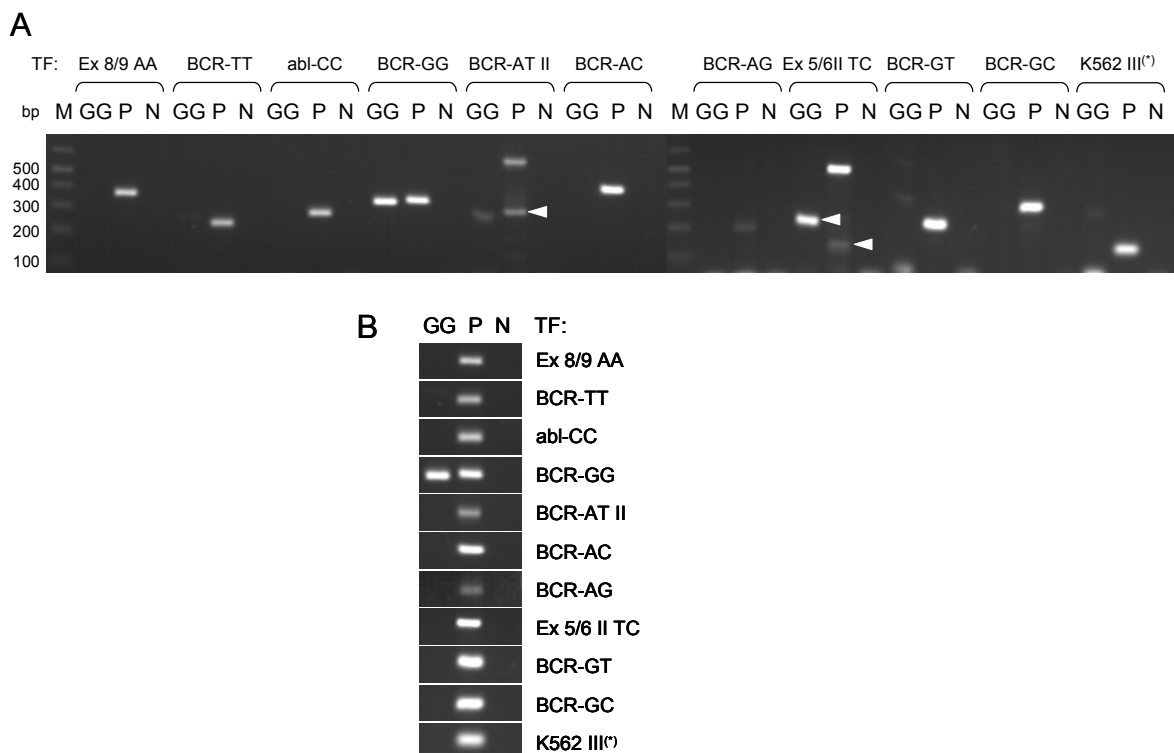
Zur Bestimmung der Nachweisgrenze einzelner Testfragmente wurde eine spezifische Kontroll-PCR von 38 Zyklen mit genomischer DNA aus einer bzw. zwei Normalzellen (Lymphozyten) durchgeführt, ohne dass diese vorher global amplifiziert worden war<sup>3</sup>. Abb. 5B zeigt den spezifischen Nachweis von neun Testfragmenten auf einem Agarosegel. Mit den Oligonukleotidprimern für die Fragmente Ex 8/9 AA und D16S3019 konnten zwei Kopien des spezifischen Templates, die aus einer Zelle stammten, nachgewiesen werden. Die DNA aus zwei diploiden Zellen, mit entsprechend vier Kopien, genügte für den Nachweis der Fragmente BCR-TT, D5S615, abl-CC, D5S399 und Her2-226 GC. Die Sensitivität des PCR-Verfahrens reichte nicht aus, um zwei bzw. vier Kopien der Fragmente D16S485, D6S1633 nachzuweisen. Da die meisten Testfragmente mit diesem Verfahren ab einer Häufigkeit von vier Kopien in einem Reaktionsansatz nachweisbar waren, wurde es als ausreichend sensitiv für eine Analyse der Reinheit von Fraktionen angesehen.

<sup>3</sup> Lymphozyten wurden aus Blut angereichert, gewaschen und in PBS aufgenommen. Es wurden je 9x eine und zwei Zellen isoliert und einem PK-Verdau zugeführt. Dieser wurde dann mit einem 1x Ansatz spezifische Kontroll-PCR gemischt, die PCR durchgeführt und das Produkt in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt.

### 3.1.3.2 Auswerteverfahren zur Analyse der Fraktionen

Zur Evaluierung von Fraktionierungsprotokollen wurden die fertigen Fraktionen einem Auswerteverfahren unterzogen, das den spezifischen Nachweis von mehreren Fragmenten mit verschiedenen Differenzierungsbasen umfasste. Mit Hilfe dieses Auswerteverfahrens wurde sowohl die Positivität als auch die Reinheit einer Fraktion geprüft.

Die PCR-Produkte der spezifischen Kontroll-PCR zeigten auf einem Agarosegel regelhaft eine klare Bande auf der erwarteten Höhe des Längenstandards. In wenigen Fällen waren Banden auf anderer Höhe zu sehen, die von einer unspezifischen Amplifikation herrührten (Abb. 6A, Horizontale Darstellungsweise, Pfeilspitzen). Das Auftreten dieser unspezifischen Banden wurde auf die hohe Sensitivität der Methode einerseits und das komplexe Sequenzgemisch der Proben andererseits zurückgeführt. Sie wurden als nicht relevant erachtet, weshalb eine Darstellungsweise für das Auswerteverfahren gewählt wurde, die keine Information über unspezifische Banden gibt (Abb. 6B, Vertikale Darstellungsweise). Mit dieser vertikalen Darstellung ist es möglich, den Nachweis von Testfragmenten in einer Probe auf einen Blick zu erfassen, weshalb sie in dieser Arbeit bevorzugt wurde.

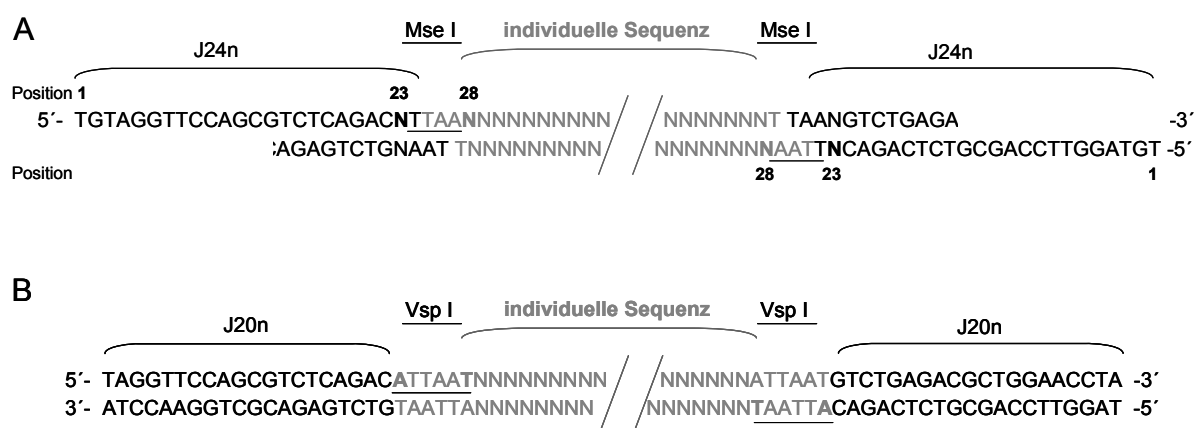


**Abb. 6** Auswertung der Fragmentzusammensetzung von Fraktionen mittels spezifischer Kontroll-PCR am Beispiel einer GG-Fraktion. **(A)** Horizontale Darstellungsweise mit unspezifischen Banden (Pfeilspitzen) **(B)** Vertikale Darstellungsweise ohne Information über unspezifische Banden (M: Marker, bp: Basenpaare, GG: GG-Fraktion, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, TF: Testfragment, (\*): hier AA-Fragment)

### 3.2 Fraktionierung durch fraktionsspezifische Adapter

Um die Fraktionen aus der Gesamtheit einer Mse I-Repräsentation selektiv anzureichern, sollte jede Fraktion mit eigenen (fraktionsspezifischen) Adaptersequenzen ausgestattet und über diese Bindestellen amplifiziert werden. Dazu sollten die Lib1-Sequenzen nur von Fragmentenden mit einer bestimmten Differenzierungsbase abgetrennt und durch neue Adaptersequenzen (26R-Adapter) ersetzt werden. Über die 26R-Adapter sollte im Anschluss die Anreicherung der Fraktion erfolgen.

Ein Restriktionsenzymverdaul in Abhängigkeit einer bestimmten Differenzierungsbase konnte mit den Restriktionsenzymen Dra I (Enzymschnittstelle: TTT'AAA), Vsp I (AT'TAAT), Ksp AI (GTT' AAC) und Bsp TI (C'TTAAG) erreicht werden, was im Folgenden als „Fraktionierungsverdaul“ bezeichnet wird. Gemeinsames Charakteristikum der Schnittstellen ist, dass sie die Mse I-Erkennungssequenz TTAA enthalten und auf der Position der Differenzierungsbase enden. Somit war die Differenzierungsbase Teil des Erkennungsmotivs. Für jede Fraktion gab es ein Enzym bzw. eine Kombination von zwei Enzymen, die benutzt werden konnten, um die Lib1-Sequenz von ihren Fragmenten abzutrennen. So wurden beispielsweise Fragmente mit den Differenzierungsbasen AA von Dra I geschnitten, Fragmente mit den Differenzierungsbasen AT von den Enzymen Dra I und Vsp I. Die Erkennungssequenzen dieser Restriktionsenzyme sind sechsstellige Palindrome, in denen die erste Nukleobase jeweils komplementär zur Differenzierungsbase ist. An dieser Position tragen alle Fragmente einer Mse I-Repräsentation die Base Guanin (vorletzte Base der Lib1-Sequenz), weshalb funktionelle Schnittstellen zunächst nur für das Enzym Ksp AI vorlagen. Für die anderen Enzyme wurden funktionelle Schnittstellen bereitgestellt, indem die Mse I-Schnittstellen zu sechsstelligen Erkennungssequenzen erweitert wurden.



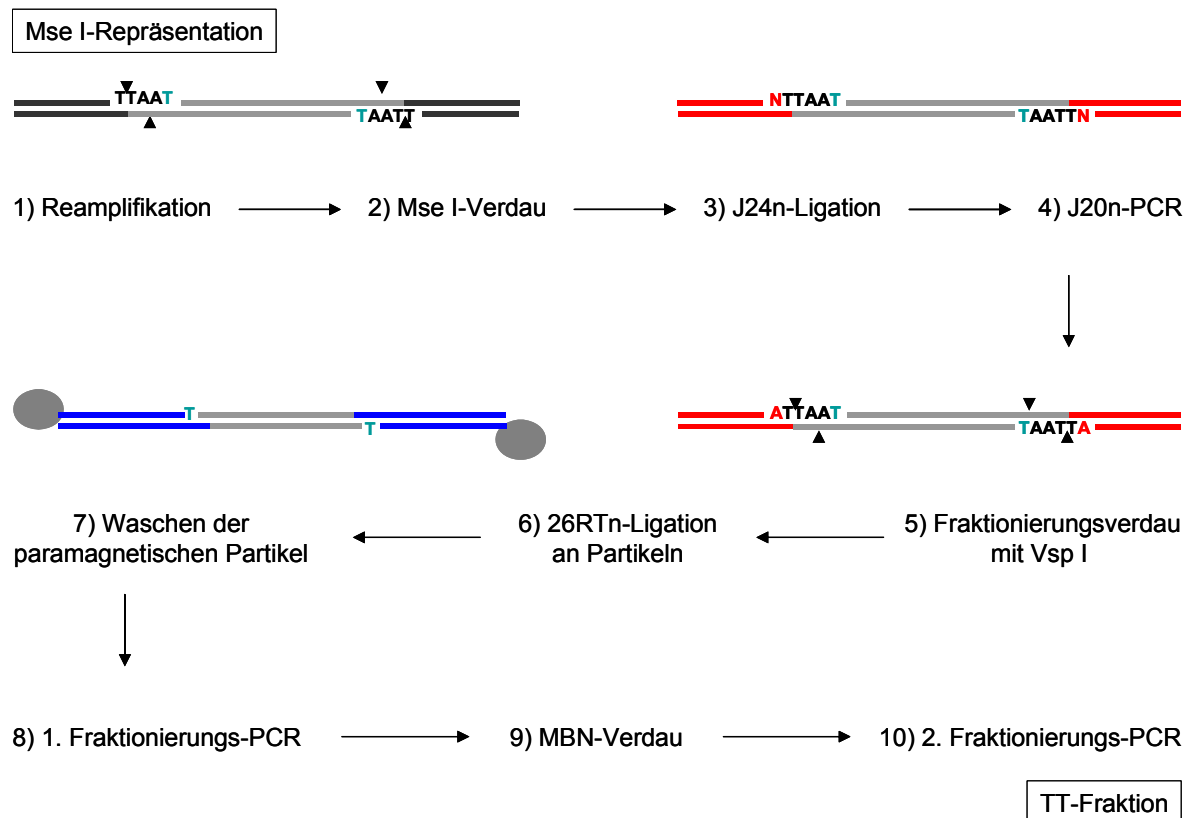
**Abb. 7** Aufbau eines doppelsträngigen Mse I-Fragmentes während der Vorbereitung zum Fraktionierungsverdaul (**A**) Fragment nach Ligation der J24n-Adapter mit nicht kovalent gebundenem kurzen Oligonukleotid: Position 23 = A, T, C oder G; Position 28 = Differenzierungsbase (**B**) Fragment mit funktionellen Schnittstellen für Vsp I nach Amplifikation mit dem Primer J20n. Unterstrichen: Enzymerkennungssequenzen

Um funktionelle Schnittstellen für die Enzyme Dra I, Vsp I, Ksp AI und Bsp TI in Mse I-Fragmenten zu generieren, wurden deren Lib1-Sequenzen mittels Mse I-Verdau abgetrennt und durch 24 Basen lange Adapter (J24n) ersetzt. Vier verschiedene doppelsträngige J24n-Adapter wurden dabei zu gleichen Teilen in eine Ligation eingesetzt, so dass es an einem Fragmentende zu einer zufälligen Kombination eines Adapters mit einer Differenzierungsbase kam. Die Oligonukleotid-Adapter J24An, J24Tn, J24Cn und J24Gn unterschieden sich nur durch eine variable Base auf Position 23 voneinander (J24An: A, J24Tn: T, J24Cn: C, J24Gn: G; Abb. 7A).

Statistisch gesehen entstand durch jede vierte Ligation eine funktionelle Schnittstelle, in der die Differenzierungsbase (Position 28, Abb. 7A) mit ihrer komplementären Base auf Position 23 kombiniert wurde. Für eine erfolgreiche Fraktionierung benötigte ein Fragment an beiden Enden funktionelle Schnittstellen. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine funktionelle Schnittstelle entstand, ergab sich aus dem prozentualen Anteil an erfolgreich verdauten Schnittstellen mal dem prozentualen Anteil an erfolgreich ligierten J24n-Adaptoren. Bei 100%iger Effizienz läge dann ein Fragment in der Prävalenz von 6,25% in einem weiter prozessierbaren Zustand vor. Dies ist unabhängig von der Verteilung der Differenzierungsbasen im Genom. Da die Erkennungssequenzen die Mse I-Schnittstelle beinhalten, trennt ein Fraktionierungsverdau die Lib1-Adapter ab, ohne die Fragmente an anderer Stelle zu schneiden.

### 3.2.1 Einfache Fraktionen

Die einzelnen Schritte des Fraktionierungsprotokolls zur Herstellung der Einfachen Fraktionen werden in Abb. 8 dargestellt und im Folgenden näher erläutert.



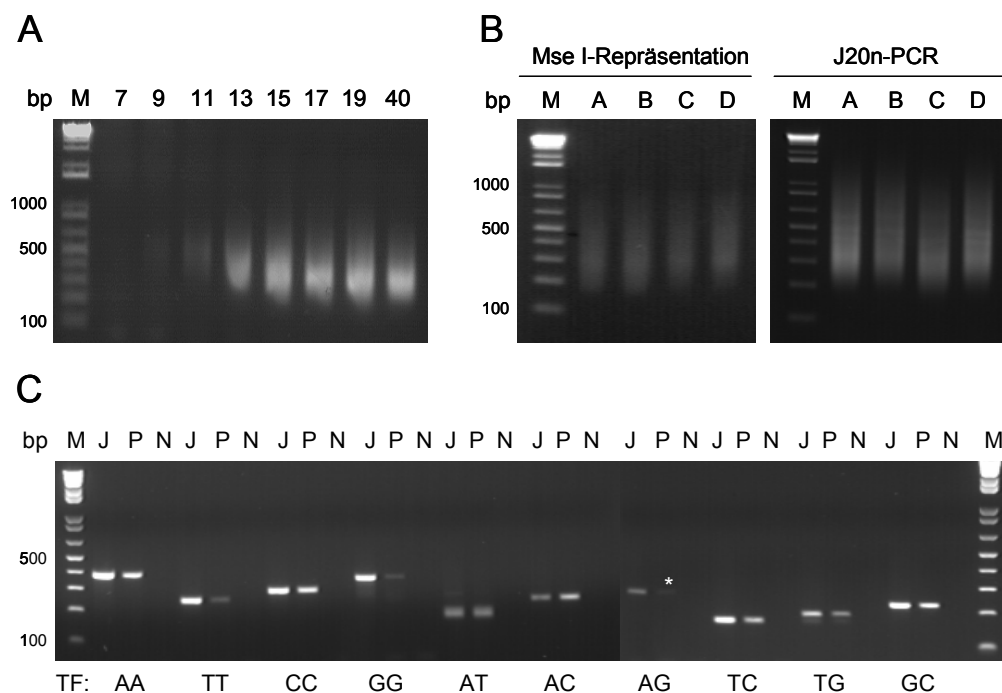
**Abb. 8** Übersicht über die Protokollschritte der Einfachen Fraktionierung am Beispiel einer TT-Fraktion (schwarz: Lib1-Adapter, rot: J24n-Adapter, blau: fraktionsspezifische Adapter bio-26RTn, grau: paramagnetische Partikel, grün: Differenzierungsbasen)

#### 3.2.1.1 Schritte 1-4: Vorbereitung und J20n-PCR

Als ersten Schritt zur Fraktionierung sah das Protokoll eine Reamplifizierung des Ausgangsmaterials mit dem Primer Lib1 vor (2.4.3.1). Danach folgte ein Mse I-Verdau des Materials und die Ligation der J24n-Adapter (2.3.2.2). Vor dem Fraktionierungsverdau wurden alle Fragmente über die J24n-Sequenz mit dem PCR-Primer J20n, der vor der variablen Base endete, in der so genannten „J20n-PCR“ nochmals amplifiziert (2.4.3.2, siehe Abb. 7B).

Es wurde die Zyklenzahl bestimmt, bei der die J20n-PCR kurz vor der Plateau-Phase stand, um nur doppelsträngige DNA in den Fraktionierungsverdau einzubringen. Dazu wurden von J20n-PCR-Produkten nach sieben bis 19 und nach 40 Zyklen je 5 µl entnommen, mit Sybr Gold gemischt, in einem Agarosegel aufgetrennt und die Intensität der Sybr Gold Fluoreszenz visuell beurteilt (Abb. 9A). Zwei zusätzliche Zyklen PCR-Produkt führten zwischen den Zyklen 7 und 19 jeweils zu

einer Zunahme an Fluoreszenz, die bis zum 40sten Zyklus nicht weiter anstieg. Anhand dieses Ergebnisses wurde die Zyklenzahl für die J20n-Amplifikation auf 19 Zyklen festgelegt und auf diese Weise unabhängig voneinander mit vier Proben (A - D) durchgeführt. Die Größenverteilung der Fragmente in diesen Proben J20n-PCR wies auf einem analytischen Agarosegel keine erkennbaren Unterschiede zu einer Mse I-Repräsentation auf (Abb. 9B). Ausgewählte Testfragmente unterschiedlicher Größen und Fraktionen wurden in einem J20n-PCR-Produkt (Probe A) ebenso wie in der Mse I-Repräsentation spezifisch nachgewiesen (Abb. 9C). Folglich konnte jede der zehn Fraktionen aus dem J20n-Material gewonnen werden. Eine Konzentrationsbestimmung mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz ergab, dass das Material nach der J20n-Amplifikation (durchschnittlich 74,89 ng/μl) im Vergleich zum Ausgangsmaterial (durchschnittlich 0,92 ng/μl) um das 80fache angereichert vorlag (nicht gezeigt).



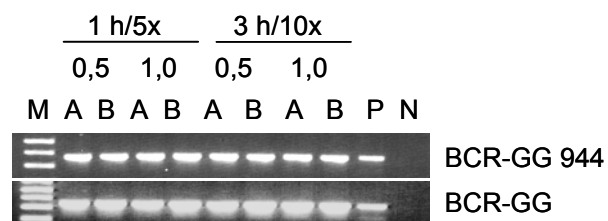
**Abb. 9** Einstellung der J20n-PCR. **(A)** Produkte aus 7 - 40 Zyklen J20n-PCR **(B)** Fragmentverteilung in den Mse I- und J20n-Ansätzen (19 Zyklen) der Proben A - D **(C)** Nachweis von Testfragmenten (TF) mit den angegebenen Differenzierungsbasen in J20n-PCR (J, Probe A) und Mse I-Repräsentation (P). TF von links nach rechts: Ex 8/9 AA, BCR-TT, abl-CC, BCR-GG, D5S816, rs2296408, D6S1633, rs740178, BCR-GT, rs2290134 (M: Marker, N: Negativkontrolle, \*: eine kontrastarme Bande war auf dem Gel erkennbar)

### 3.2.1.2 Schritt 5: Fraktionierungsverdau

Für die Herstellung der Einfachen Fraktionen wurde DNA aus einer J20n-PCR mit einem der vier Restriktionsenzyme inkubiert und anschließend mit einer neuen Adaptersequenz versehen. Da die Fragmente der Gemischten Fraktionen zwei verschiedene Differenzierungsbasen enthielten, umfasste

das Protokoll zu ihrer Herstellung je zwei Restriktionsenzym-Reaktionen und zwei Adapterligationen (s. u.).

Eine hohe Religationsrate beim Einbringen der fraktionsspezifischen Adapter wurde als besonders wichtig für die Vollständigkeit der resultierenden Fraktion angesehen. Daher sollte der Restriktionsverdau vollständig, jedoch ohne unspezifische Aktivität der Enzyme (*star activity*) verlaufen. Verschiedene Reaktionsbedingungen wurden mit dem Enzym Bsp TI getestet, da es in Vorversuchen als einziges der vier Enzyme eine unregelmäßige Enzymaktivität gezeigt hatte. Die besten Bedingungen wurden anschließend für einen Verdau mit den anderen Enzymen übernommen. 6 µg DNA aus einer J20n-PCR wurden für eine Stunde mit 30 Einheiten (U; „5fach Überverdau“) und für drei Stunden mit 60 U Bsp TI („10fach Überverdau“) inkubiert, dann 0,5 µg und 1,0 µg dieser DNA mit spezifischen Adaptern ligiert und daraus GG-Fraktionen hergestellt (Erläuterungen zum weiteren Vorgehen s. u.)<sup>4</sup>. Die Qualität des Bsp TI-Verdaus wurde anhand des spezifischen Nachweises von GG-Fragmenten in den Fraktionen beurteilt. Der Nachweis der Fragmente BCR-GG 944 und BCR-GG war für alle GG-Fraktionen gleichermaßen positiv (Abb. 10). Um auch bei schwankender Enzymaktivität einen vollständigen Verdau des Materials zu gewährleisten, wurde ein einstündiger Verdau mit 10 Einheiten Enzym (U) pro µg DNA als Standardreaktion eingeführt.



**Abb. 10** Einfluss der Enzymaktivität der Bsp I-Reaktion auf die Positivität von GG-Fraktionen, für deren Herstellung 0,5 bzw. 1,0 µg DNA verwendet wurden (1 h/5x: 5fach Überverdau für 1 h, 3 h/10x: 10fach Überverdau für 3 h, A: Fraktionierung ohne MBN-Verdau, B: mit MBN-Verdau, s. u.).

### 3.2.1.3 Schritt 6: Ligation fraktionsspezifischer 26R-Adapter

In einer T4-DNA-Ligase Reaktion wurden fraktionsspezifische Adapter an Fragmente aus einem Fraktionierungsverdau angefügt. Die Sequenzen der vier Adapter 26RAn, 26RTn, 26RC und 26RGn sollten eine möglichst geringe Übereinstimmung aufweisen, um einer Kreuzreaktivität der PCR-Primer vorzubeugen. Ebenso sollten sie eine besonders geringe Ähnlichkeit zu der J20n-Sequenz haben, damit es nicht zu einer unspezifischen Amplifikation von J20n-Fragmenten kommen konnte. Die Sequenzen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms (Vektor NTI) erstellt; ihre 3'-Enden

<sup>4</sup> 6 µg J20n-Produkt wurden mit 30 U Bsp I für 1 h bzw. mit 60 U für 3 h inkubiert und anschließend über eine Wizard® SV PCR gereinigt. 0,5 und 1,0 µg DNA wurden mittels Quick Ligation an bio-26RGn-Adapter ligiert und indirekt positiv selektiert. Die darauf folgende Fraktionierung wurde mit dem Primer 23R'Gm einmal mit und einmal ohne MBN-Verdau durchgeführt.

waren so aufgebaut, dass durch eine Ligation wieder eine funktionelle Schnittstelle für das betreffende Restriktionsenzym entstand (Tab. 26).

Eine hohe Effizienz bei der Ligation der 26R-Adapter war eine Voraussetzung für eine hohe Wiederfindungsrate von erwünschten Fragmenten nach der Fraktionierung. In der Regel ist die Ligation von glatten DNA-Enden, wie sie die Enzyme Dra I und Ksp AI erzeugen, durch die T4-DNA-Ligase weniger effizient, als die von überhängenden DNA-Enden, wie sie die Enzyme Vsp I und Bsp TI erzeugen. Daher wurden die Ligations-Bedingungen für 26R-Adapter an Fragmenten etabliert, die mit Ksp AI behandelt worden waren und für Dra I, Vsp I und Bsp TI übernommen.

**Tab. 26** Fraktionsspezifische Adapter

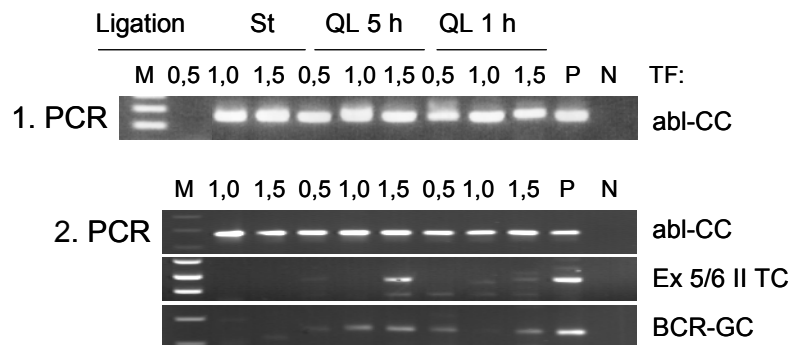
Fraktion	Enzym	Schnittstelle	Spezifischer Adapter	Sequenz 5'→3'
			J20n	TAG GTT CCA GCG TCT CAG AC
AA	Dra I	TTT'AAA	26RAn	AAT TCG TCA ATC AGC TGC GCT TGT TT
TT	Vsp I	AT'TAAT	26RTn	GTA TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AT
CC	Ksp AI	GTT'AAC	26RC	CTA TCG CAC TCG ACT ATC CTC TGG TT
GG	Bsp TI	C'TTAAG	26RGn	TCT GAG CAA ATG ACC ATG CAG CAC C
AT	Dra I; Vsp I		26RAn; 26RTn	
AC	Dra I; Ksp AI		26RAn; 26RC	
AG	Dra I; Bsp TI		26RAn; 26RGn	
TC	Vsp I; Ksp AI		26RTn; 26RC	
TG	Vsp I; Bsp TI		26RTn; 26RGn	
GC	Bsp TI; Ksp AI		26RGn; 26RC	

Es wurden eine Standardligation, eine fünfstündige und eine einstündige Quick Ligation von 26RC-Adaptoren mit gestaffelten Mengen an DNA durchgeführt und die Proben anschließend über diesen Adapter in zwei aufeinander folgenden PCR amplifiziert (Fraktionierungsbedingungen s. u.)<sup>5</sup>. Die Bewertung der verschiedenen Ligations-Bedingungen erfolgte durch eine Analyse der CC-Fraktionen mittels spezifischer Kontroll-PCR.

Im Gegensatz zu einer Quick Ligation (5 h und 1 h) wurde bei einer Standardligation von 0,5 µg DNA die Untergrenze für eine erfolgreiche Anreicherung des Fragments abl-CC unterschritten (Abb. 11). Die anderen DNA-Mengen führten mit jedem der drei Ligationsverfahren zu abl-CC positiven Fraktionen. Bei einer Quick Ligation von 1,5 µg DNA kam es zur Anreicherung der unerwünschten Fragmente Ex 5/6 II TC und BCR-GC, wobei dieser Effekt nach 5 h deutlicher war, als nach einer 1 h. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für Ligationen bis zu 1,0 µg Template in der Regel einstündige Quick Ligase Reaktionen verwendet. Die Standardligation wurde bei Template-Mengen über 1,0 µg eingesetzt bzw. wenn der Ligationsansatz über eine DNA-Säule aufgereinigt werden sollte. Dies ist nach einer Quick Ligation nicht möglich, da ihr Puffer die Säule verstopfen kann.

<sup>5</sup> 6 µg J20n-Produkt wurden mit 60 U Ksp AI für 1 h inkubiert und anschließend über eine *Wizard® SV PCR* gereinigt. 0,5, 1,0 und 1,5 µg DNA wurden mittels Quick Ligation an bio-26RC-Adapter ligiert und indirekt positiv selektiert. Die darauf folgende Fraktionierung wurde mit dem Primer 23R'Cm mit MBN-Verdau durchgeführt.





**Abb. 11** Vergleich von Ligationsverfahren zur Fraktionierung mittels 26RC-Adapter; Nachweis von Testfragmenten nach der 1. und 2. PCR von CC-Fractionen, für die 0,5 bzw. 1,0 bzw. 1,5 µg DNA verwendet wurden (St: Standardligation, QL: Quick Ligation, M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

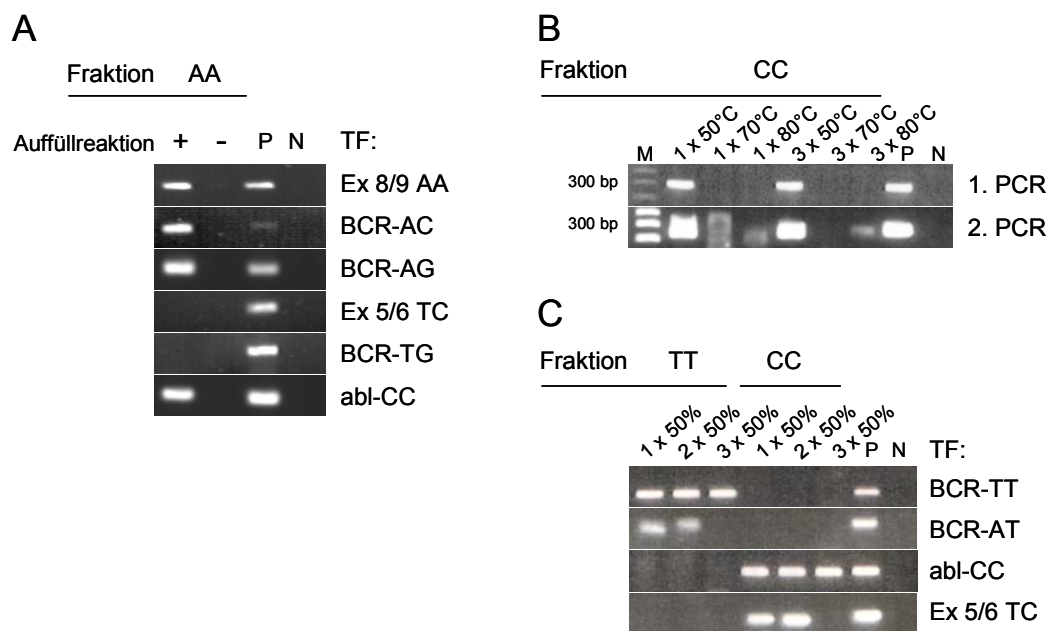
### 3.2.1.4 Schritt 7: Positivselektion an paramagnetischen Partikeln

Eine positive Selektion der erwünschten Fragmente durch paramagnetische Partikel wurde sowohl bei den Einfachen als auch den Gemischten Fraktionen angewandt. Es wurde eine Positivselektion durchgeführt, bei der die biotinylierten 26R-Adapter zuerst an Streptavidin-beschichtete Partikel gekoppelt und dann mit den Zielfragmenten ligiert wurden („Positivselektion mit Ligationskopplung“, 2.10.2). Nach der Ligation wurden nicht gebundene Fragmente durch das Waschen der Partikel aus dem Ansatz abgetrennt und dann die Fraktionierungs-PCR mit 23R'-Primern durchgeführt. Zur optimalen Bindung der Zielfragmente wurde zuerst die benötigte Menge an Partikeln berechnet und dann verschiedene Waschprotokolle für paramagnetische Partikel zweier Hersteller (Dynal und Roche) getestet (2.10). Die Waschbedingungen für paramagnetische Partikel wurden anfänglich nach den Vorgaben aus der Diplomarbeit von D. Biener (Biener 2000) beibehalten, erwiesen sich jedoch als nicht ausreichend stringent. Die Etablierung neuer Waschbedingungen erfolgte zunächst für die Einfache Fraktionierung an Dynal Streptavidin-Partikeln.

Formamid hat eine destabilisierende Wirkung auf doppelsträngige DNA, weshalb es den Waschpuffern zugegeben und sein Einfluss auf das Ergebnis der Fraktionierung untersucht wurde. Abb. 12A zeigt den Einfluss eines Waschpuffers mit 50% Formamid (WP<sub>250</sub>), der mit den Partikeln bei 50°C für 4 min inkubiert wurde, auf zwei AA-Fractionen<sup>6</sup>. Davon war eine vor dem Waschen einer Auffüllreaktion der Oligonukleotid-Adapter unterzogen worden, die andere nach dem Waschen. In der Auffüllreaktion wurden die Bindestellen für die Fraktionierungsprimer durch eine DNA-Polymerase auf dem Gegenstrangs des langen Oligonukleotids des Adapters generiert. Sie konnte nur erfolgen, solange ein DNA-Fragment doppelsträngig vorlag.

<sup>6</sup> 6 µg J20n-Produkt wurden mit 60 U Dra I für 1 h inkubiert und anschließend über eine *Wizard® SV PCR* gereinigt. 0,5 µg DNA wurden mittels Quick Ligation an bio-26RAn-Adapter ligiert und indirekt positiv selektiert. Die darauf folgende Fraktionierung wurde mit bzw. ohne Auffüllreaktion mit dem Primer 23R'An ohne MBN-Verdau durchgeführt.

Das Auslassen der Auffüllreaktion vor dem Waschen führte dazu, dass in der AA-Fraktion keines der Testfragmente nachgewiesen werden konnte. Das Experiment zeigt, dass die Fragmente an den Partikeln durch das Waschen denaturiert und ihre Gegenstränge mit dem Überstand aus dem Ansatz entfernt wurden. Die Auffüllreaktion der Adapter wurde daher im Fraktionierungsprotokoll vor das Waschen der Partikel gestellt. Da die andere AA-Fraktion zwar das Positivfragment Ex 8/9 AA enthielt, zusätzlich jedoch auch unerwünschte Fragmente, wurde die Stringenz der Waschbedingungen weiter erhöht.



**Abb. 12** Einfluss von formamidhaltigen Waschpuffern und der Erhöhung der Wascht Temperatur auf die Fraktionierung **(A)** AA-Fraktionen mit und ohne Auffüllreaktion vor dem Waschen der paramagnetischen Partikel für 1 x 4 min mit 50% Formamid bei 50°C **(B)** Nachweis des Testfragmentes abl-CC nach der 1. und 2. Fraktionierungs-PCR in CC-Fraktionen mit Auffüllreaktion vor dem Waschen: 1 bzw. 3 x 4 min, 50% Formamid bei 50, 70 und 80°C **(C)** TT- und CC-Fraktionen mit Auffüllreaktion vor dem Waschen: 1 – 3 x 4 min, 50% Formamid, 50°C (P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, TF: Testfragment)

Es wurde untersucht, bei welcher Temperatur die Partikel mit WP<sub>250</sub> gewaschen werden konnten, ohne dass die DNA degradiert wurde. Dazu wurde eine Positivselektion von CC-Fragmenten mit Auffüllreaktion und anschließend einem bzw. drei Waschschritten bei 50, 70 und 80°C durchgeführt und daraus CC-Faktionen hergestellt<sup>7</sup>. Abb. 12B zeigt, dass eine Erhöhung der Wascht Temperatur auf 70 bzw. 80°C die Anreicherung von Positivfragmenten verhinderte, unabhängig davon, ob ein oder drei Waschschriffe erfolgten. Bei einer Temperatur von 50°C blieben in beiden Fällen die erwünschten Fragmente erhalten.

<sup>7</sup> 6 µg J20n-Produkt wurden mit 60 U Ksp AI für 1 h inkubiert und anschließend über eine Wizard<sup>®</sup> SV PCR gereinigt. 0,5 µg DNA wurden mittels Quick Ligation an bio-26RC-Adapter ligiert und indirekt positiv selektiert. Die darauf folgende Fraktionierung wurde mit Auffüllreaktion mit dem Primer 23R'Cn mit MBN-Verdau durchgeführt.

Danach wurde die Anzahl der Waschschr tte ermittelt, die unspezifisch gebundene Fragmente zuverlässig aus dem Fraktionierungsansatz abtrennte. Dazu wurden TT- und CC-Fraktionen hergestellt, die vor dem Waschen einer Auffüllreaktion unterzogen worden waren, und einmal, zweimal bzw. dreimal für 4 min bei 50 C gewaschen wurden. Der erste Waschschr tt wurde dabei durch die Zugabe von 0,1% SDS in den Waschpuffer verändert (WP<sub>1</sub>50), für die anderen Waschschr tte wurde weiterhin WP<sub>2</sub>50 benutzt<sup>8</sup>. Aus Abb. 12C wird deutlich, dass zur vollständigen Abtrennung fraktionsfremder Fragmente wie beispielsweise BCR-AT im Falle der TT-Fraktionierung und Ex 5/6 TC im Falle der CC-Fraktionierung drei Waschschr tte benötigt wurden.

Nach einer solchen Positivselektion verbleiben noch unerwünschte Fragmente im Ansatz, die über den markierten Adapter ebenfalls an die Partikel gebunden sind und durch Waschen nicht entfernt werden können. Es handelt sich einerseits um gemischte Fragmente, die mit der zu selektierenden Fraktion eine Differenzierungsbase teilen und daher ebenfalls positiv selektiert werden. Während der 1. Fraktionierungs-PCR kommt es zu einer linearen Amplifikation dieser unerwünschten gemischten Fragmente. Sie können mittels enzymatischem Verdau aus den Probenans tzen entfernt werden (s. u. MBN-Verdau, 3.2.1.5.2). Zum anderen handelt es sich um einfache Fragmente, die an beiden Enden die Differenzierungsbase tragen, über die eine Gemischte Fraktion positiv selektiert werden soll. So werden beispielsweise bei der AT-Fraktionierung mit einem markierten 26RAn-Adapter auch alle Fragmente der Fraktion AA positiv selektiert. Strategien zur Eliminierung dieser Fragmente werden in 3.2.3 behandelt.

### **3.2.1.5 Schritte 8 - 10: Anreichern einer Fraktion**

Im Anschluss an die Positivselektion wurden die verbleibenden Fragmente über die 26R-Adapter mittels 23 Basen langen Oligonukleotidprimern (23R'-Primer) in zwei aufeinander aufbauenden Fraktionierungs-PCR amplifiziert.

Die Sequenzen der 23R'-Primer entsprachen den jeweiligen 26R-Oligonukleotiden, waren jedoch am 5' Ende um sechs bis acht Basen eingerückt und insgesamt drei Basen kürzer. Die Bindestelle für einen 23R'-Primer stellte der Gegenstrang zum langen Oligonukleotid eines 26R-Adapters, welcher nach dem Abdissoziieren des kurzen Moleküls in der so genannten Auffüllreaktion durch eine DNA-Polymerase synthetisiert werden musste. Die Bedingungen für die Fraktionierungs-PCR mit 23R'-Primern sind dem Methodenteil zu entnehmen (2.4.2.2).

#### **3.2.1.5.1 Einfluss der 23R'-Primersequenz**

Die Sequenzen der 23R'-Fraktionierungsprimer orientierten sich an den spezifischen Adaptersequenzen der 26R-Adapter. Auf Grund der Erkenntnisse aus 3.5 wurde versucht, die Selektionsfähigkeit der 23R'-Primer durch die Gestaltung ihrer Sequenz zu optimieren. Es wurden zwei Typen von 23R'-Primern getestet: Während die 23R'-m-Primer die Mse I-Schnittstelle inklusive

---

<sup>8</sup> Ligationskopplung über bio-26RTn bzw. bio-26RC, Fraktionierung mit Auffüllreaktion und MBN-Verdau, Primer 23R'Tm bzw. 23R'Cm

der Differenzierungsbase ( $D_{in}$ ) überspannten, endeten die Fraktionierungsprimer 23R'n vor bzw. innerhalb der Schnittstelle ( $D_{ex}$ ). Zusätzlich wurde der Primer 23R'o für die GG-Fraktionierung getestet, der dem 23R'm-Primer mit zwei mismatch-Basen entsprach (Tab. 27).

**Tab. 27** 23R'-Fraktionierungsprimer

Sequenzen Fraktionierungsprimer (5'→3')	
23R'An	AAT TCG TCA ATC AGC TGC GCT TG
23R'Am	TCA ATC AGC TGC GCT TGT <b>TTA AA</b>
23R'Tn	TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AT
23R'Tm	CTC GGC TCA ACG TCA GGA <b>TTA AT</b>
23R'C	TCG CAC TCG ACT ATC CTC TGG TT
23R'Cm	CAC TCG ACT ATC CTC TGG <b>TTA AC</b>
23R'G	GAG CAA ATG ACC ATG CTA GCA CC
23R'Gm	AAT GAC CAT GCT AGC ACC <b>TTA AG</b>
23R'Go	CAA ATG ACC AT <b>C</b> <b>GTA</b> GCA CC <b>TTA A G</b>

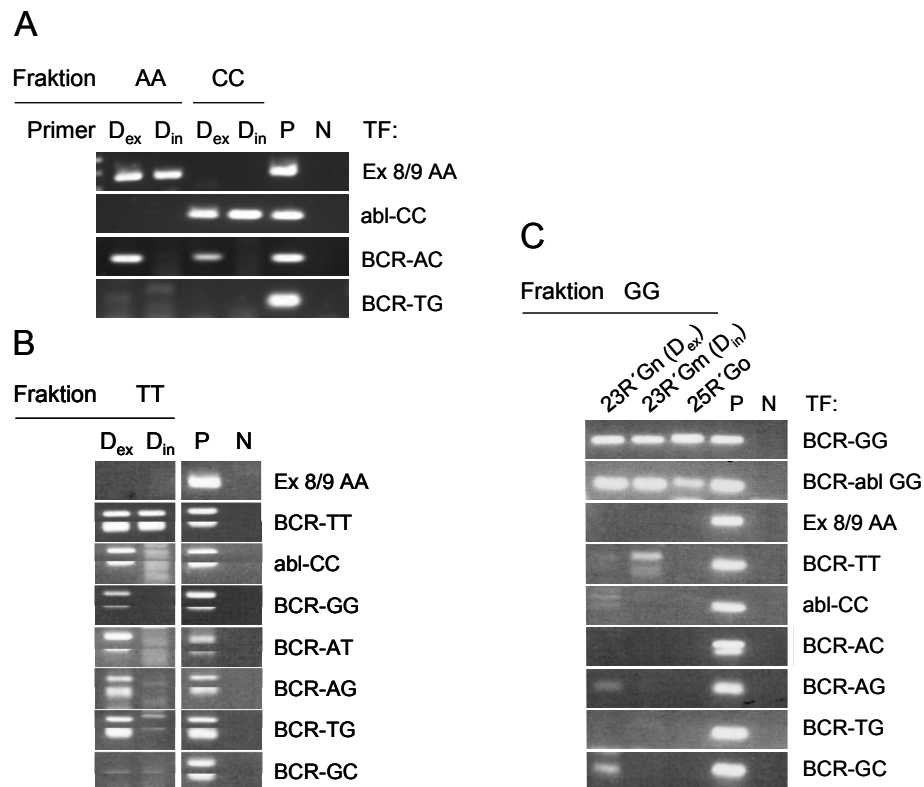
*kursiv*: Mse I-Schnittstelle, **fett**: Differenzierungsbase, **fett kursiv**: mismatch-Basen

Abb. 13A und B zeigen den Vergleich zwischen je zwei AA-, CC- und TT-Fractionen, die mit 23R'n- bzw. 23R'm-Primern in beiden Fraktionierungs-PCR amplifiziert wurden<sup>9,10</sup>. In den Fractionen wurden die erwünschten Fragmente Ex 8/9 AA, abl-CC bzw. BCR-TT nachgewiesen. Das unerwünschte Fragment BCR-AC wurde sowohl in der AA-Fraktion, als auch in der CC-Fraktion nachgewiesen, für die ein 23R'n-Primer verwendet worden war, nicht jedoch in denen, für die ein 23R'm-Primer verwendet worden war (Abb. 13A). In den Fractionen TT war dieser Unterschied besonders deutlich zu sehen: im Gegensatz zu den 23R'm-Primern, die sechs von sieben unerwünschten Fragmenten in der Fraktionierung abtrennten, eliminierten die 23R'n-Primer nur zwei von sieben Fragmenten (Abb. 13B). Weiterhin wurden GG-Fractionen mit den Primern 23R'Gn, 23R'Gm und 23R'Go angefertigt<sup>11</sup>, und auf das Vorkommen von unerwünschten Fragmenten getestet. 23R'Gn und 23R'Gm erzielten Fractionen mit je einem falsch positiven Ereignis, 23R'Go konnte die GG-Fraktion ganz ohne falsch positive Fragmente anreichern. Allerdings war hier die Anreicherung des BCR-ABL GG Fragmentes leicht beeinträchtigt (Abb. 13C). Da die Reinheit der Fractionen durch die 23R'm-Primer zunahm, wurden sie für alle Fraktionierungen als Standard übernommen.

<sup>9</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 0,6 µg DNA aus einem Dra I- bzw. Ksp AI Verdau mit je 40 µl Partikel über bio-26RAn bzw. 26RC und Fraktionierungen mit 23R'Am bzw. 23R'Cm oder 23R'An bzw. 23R'Cn mit MBN-Verdau durchgeführt

<sup>10</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 0,6 µg DNA aus einem Vsp I-Verdau mit je 40 µl Partikel über bio-26RTn und eine Fraktionierung mit 23R'Tm bzw. 23R'Tn mit MBN-Verdau durchgeführt

<sup>11</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 0,6 µg DNA aus einem Bsp TI-Verdau mit je 40 µl Partikel über bio-26RGn und eine Fraktionierung mit 23R'Gm bzw. 23R'Gn bzw. 25R'Go mit MBN-Verdau durchgeführt



**Abb. 13** Einfluss der Sequenz von 23R'-Primern auf die Reinheit der Fraktionen. **(A)** AA- und CC-Fraktionen mit den Fraktionierungsprimern 23R'An und 23R'Cn (D<sub>ex</sub>) bzw. 23R'Am und 23R'Gm (D<sub>in</sub>) **(B)** TT-Fraktionen mit 23R'Tn (D<sub>ex</sub>) bzw. 23R'Tm (D<sub>in</sub>) **(C)** GG-Fraktionen mit 23R'Gn, 23R'Gm, 23R'Go (D<sub>ex</sub>: Primer endete vor der Differenzierungsbase, D<sub>in</sub>: Primer endet mit der Differenzierungsbase, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

### 3.2.1.5.2 MBN-Verdau

In dem Produkt einer 1. Fraktionierungs-PCR lagen neben den doppelsträngigen erwünschten auch einzelsträngige unerwünschte Gemischte Fragmente vor. Diese teilten mit der gewünschten Fraktion eine Differenzierungsbase, wurden daher über den markierten 26R-Adapter positiv selektiert und über dessen Primerbindestelle linear amplifiziert. Um diese Fragmente zu entfernen, wurde das Produkt der 1. Fraktionierungs-PCR mit einer Einzelstrang-DNA-spezifischen Nuklease, der *Mung Bean Nuclease* (MBN), inkubiert.

Es wurde untersucht, wie sich ein MBN-Verdau des Produktes der ersten Fraktionierungs-PCR vor der 2. Fraktionierungs-PCR auf die Ausbeute von erwünschten Fragmenten einerseits und die Reinheit der Fraktionen andererseits auswirkt. Zu diesem Zweck wurden AA-Fraktionierungen mit je 40 Zyklen PCR durchgeführt, wobei diese entweder auf nur eine Fraktionierungs-PCR fielen oder auf zwei aufeinander aufbauende Fraktionierungs-PCR von 15 und 25 Zyklen aufgeteilt wurden. Im letzteren Fall wurden Fraktionen mit und ohne einen MBN-Verdau zwischen den beiden PCR angefertigt<sup>12</sup>.

<sup>12</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 0,25 µg DNA aus einem Dra I-Verdau mit je 10 µl Partikel über bio-26Ran-Adapter durchgeführt, die Partikel bei 50°C für je 30 s gewaschen, eine Auffüllreaktion und eine Fraktionierung mit 23R'Am mit und ohne MBN bzw. eine PCR mit 40 Zyklen nach dem Programm „1. PCR-EF/GF“ durchgeführt

Weiterhin wurde zwischen verschiedenen Waschprotokollen unterschieden, bei denen die paramagnetischen Partikel einmal oder zweimal für ca. 30 Sekunden entweder mit 30 bzw. 50% Formamid im Waschpuffer bei 50°C gewaschen wurden (Auffüllreaktion nach dem Waschen). Fraktionsfremde Fragmente konnten in einigen Fällen nach 40 Zyklen nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob diese in einer PCR oder aufgeteilt auf 15 und 25 Zyklen in zwei PCR stattgefunden hatten (Abb. 14A). Dabei ließ sich keine Regel erkennen, nach der ein bestimmtes Waschprotokoll die Reinheit der Fraktionen begünstigen würde. Im Gegensatz dazu war ein MBN-Verdau von Vorteil für die Anreicherung von reinen AA-Fraktionen. Hier waren die Proben, die einmal gewaschen wurden, positiv für Ex 8/9 AA und rein in Bezug auf die anderen Testfragmente. Zwei Waschschrte führten sowohl mit 30 als auch 50% Formamid zum Verlust des Fragmentes Ex 8/9 AA. Dies lässt sich damit erklären, dass die Fragmente nach zwei Waschschrten von 30 Sekunden denaturiert wurden und die Primerbindestellen in der anschließenden Auffüllreaktion nicht mehr synthetisiert werden konnten.

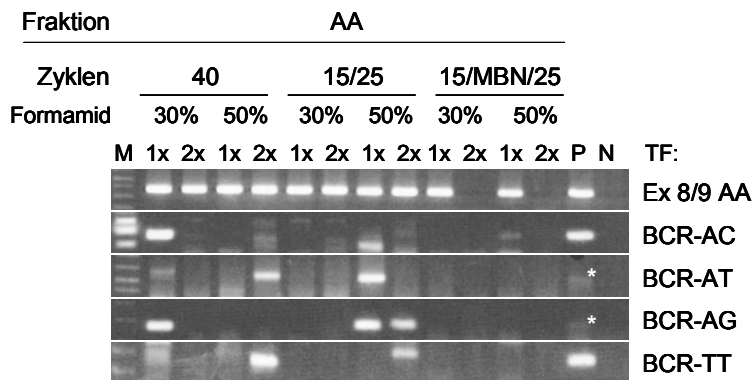
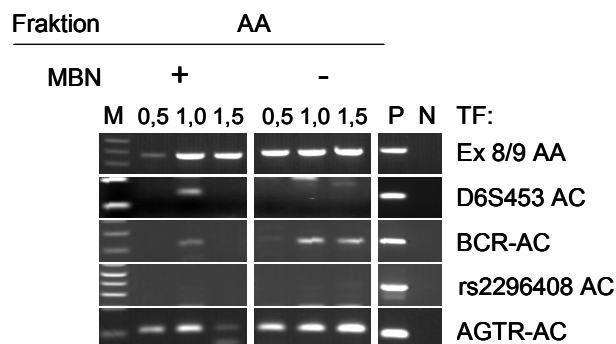
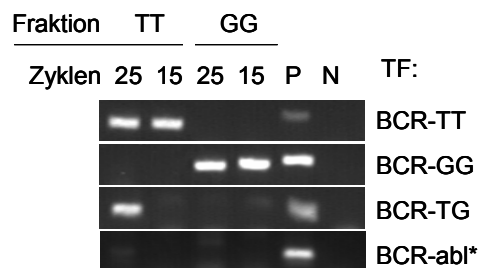
Es wurde ermittelt, ob der Einfluss des MBN-Verdaus abhängig von der DNA-Menge war, die in die Fraktionierung eingesetzt wurde. Dazu wurde DNA aus einem Fraktionierungsverdau mit Dra I in den Mengen 0,5, 1,0 und 1,5 µg in eine Quick Ligation an 26RAn-Adpater eingesetzt und über paramagnetische Partikel positiv selektiert. Daraus wurden AA-Fraktionen mit und ohne MBN-Verdau zwischen zwei Fraktionierungs-PCR angefertigt<sup>13</sup> und diese auf das Vorhandensein von Testfragmenten untersucht. In AA-Fraktionen mit MBN-Verdau wurden insgesamt weniger AC-Testfragmente nachgewiesen, als in Proben ohne MBN-Verdau. Wenn nur 0,5 µg Template-DNA eingesetzt wurden, fiel der Nachweis des Fragments Ex 8/9 AA in Fraktionen mit MBN-Verdau schwächer aus als ohne (Abb. 14B). Es konnte in diesem Fall keine Korrelation von höheren DNA-Mengen mit dem häufigeren Auftreten von unerwünschten Fragmenten getroffen werden.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich der MBN-Verdau in Abhängigkeit von der Zyklenzahl auf die Fraktionen TT und GG auswirkt. Sie wurden nach dem beschriebenen Vorgehen aus J20n-Material hergestellt<sup>14</sup>. Dabei betrug die Zyklenzahl in der 1. Fraktionierungs-PCR je einmal 25 und einmal 15 Zyklen. Es ist zu erkennen, dass in allen Fraktionen die gewünschten Fragmente gleichermaßen angereichert wurden (Abb. 14C). Allerdings wurde das Fragment BCR-GT durch den MBN-Verdau in der TT-Fraktion nach 25 Zyklen in der 1. PCR nicht mehr abgebaut. Aus diesem Grund wurde die Zyklenzahl in der 1. Fraktionierungs-PCR auf 15 festgelegt.

---

<sup>13</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 0, 5, 1,0 und 1,5 µg DNA aus einem Dra I-Verdau mit je 20 µl Partikel über bio-26RAn-Adapter und eine Fraktionierung mit 23R'Am (1. PCR 20 Zyklen, 2. PCR 25 Zyklen) mit und ohne MBN-Verdau durchgeführt

<sup>14</sup> Es wurde eine Ligationskopplung von 1 µg DNA aus einem Vsp I-Verdau mit je 20 µl Partikel über bio-26RTn-Adapter und eine Fraktionierung mit 23R'Tm mit MBN-Verdau durchgeführt

**A****B****C**

**Abb. 14** Einfluss der PCR-Zyklen und des MBN-Verdaus auf die Reinheit der Einfachen Fraktionen. **(A)** Einfluss von 40 Zyklen PCR in Abhängigkeit eines MBN-Verdaus auf AA-Fraktionen bei verschiedenen Waschprotokollen **(B)** Einfluss des MBN-Verdaus in Abhängigkeit von der DNA-Menge auf die Fraktion AA **(C)** TT- und GG-Fraktionen mit 25 bzw. 15 Zyklen in der 1. PCR und einem MBN-Verdau (BCR-ABL\*: in TT-Fraktionen GG-Fragment, in GG-Fraktionen TT-Fragment; P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, M: Marker, \*: Banden waren sichtbar aber kontrastarm)

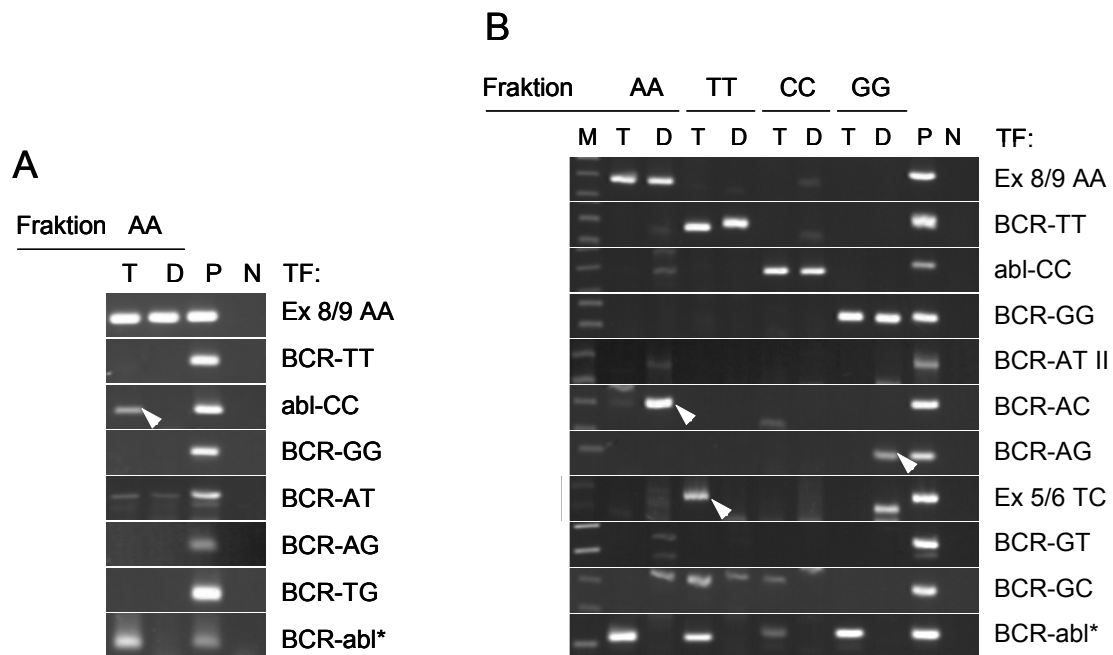
### 3.2.2 Überblick und Reproduzierbarkeit (Einfache Fraktionen)

Das hier vorgestellte Protokoll (Abb. 8) leistete die reproduzierbare Fraktionierung von positiven und reinen Einfachen Fraktionen aus Mse I-Repräsentationen (detailliertes Protokoll im Anhang). In der Regel wurden zur Fraktionierung Mse I-Repräsentationen verwendet, die über den Adapter Lib1 amplifiziert worden waren, das Protokoll konnte aber auch auf Mse I-Repräsentationen angewendet werden, die eine andere Adaptersequenz (MseLig 21: AGTGGGATTCCGCATGCTAGT) trugen (Abb. 15A).

Um den Grad ihrer Reinheit zu messen, wurden je vier Einfache Fraktionen aus den Tester- und Driverpools des BCR-ABL Testsystems, des Patienten A und der Zelllinie PT1590, die aus dem Primärtumor eines Ösophaguskarzinom-Patienten stammt (Hosch, Kraus et al. 2000), hergestellt und ihre Fragmentzusammensetzung mittels spezifischer Kontroll-PCR analysiert. Anhand dieser Ausleseverfahren wurde der Anteil an falsch positiv nachgewiesenen Testfragmenten in den Einfachen

Fraktionen bestimmt. Um zu zeigen, dass die Fragmentzusammensetzung in den Fraktionen stabil war, wurden die Fraktionen reamplifiziert und das Ausleseverfahren wiederholt.

Abb. 15B zeigt anhand des Ausleseverfahrens für die Einfachen Fraktionen aus Tester- (T) und Driverpool (D) des BCR-ABL Testsystems, wie die Auswertung der spezifischen Kontroll-PCR vorgenommen wurde: In Fraktionen, die Positivität zeigten, wurden Banden auf gleicher Höhe mit einer Positivkontrolle als falsch positive Ereignisse (Pfeilspitzen) gezählt, wenn das nachgewiesene Fragment nicht die Differenzierungsbasen der Fraktion aufwies.



**Abb. 15** Positivität und Reinheit der Einfachen Fraktionen für Tester (T) und Driver (D) des BCR-ABL Testsystems **(A)** T und D aus Mse I-Repräsentationen mit Mse21-Adapter **(B)** T und D aus Mse I-Repräsentationen mit Lib 1-Adapter (M: Längenstandard, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, TF: Testfragmente, Pfeilspitze: falsch positives Ereignis, \*: Positivfragment in Proben T)

Tab. 28 fasst die Ergebnisse der Ausleseverfahren von den genannten Einfachen Fraktionen zusammen. Der Anteil falsch positiver Ereignisse lag in AA- und TT-Fraktionen bei 3,5%, in CC-Fraktionen bei 5,2% und in GG-Fraktionen bei 7,2% (2. PCR, Tab. 28A). Diese Werte verringerten sich nach einer Reamplifizierung der TT-, CC-, und GG-Fraktionen auf 0, 3,4 und 5,4% respektive (Reamplifizierung, Tab. 28A). In der AA-Fraktion stieg der Wert nach der Reamplifizierung von 3,5 auf 5,2%. Bei einer Auswertung nach Testsystemen liegt der Anteil an unerwünschten Ereignissen in Fraktionen der Zelllinie PT1590 bei 2,7% (2. PCR und Reamplifizierung), in Fraktionen des Patienten A bei 7,9 bzw. 2,6% und in Fraktionen des BCR-ABL Testsystems bei 3,9 bzw. 5,5% (Tab. 28B). Von allen untersuchten Ereignissen waren nach der 2. PCR 4,9% falsch positiv, nach der Reamplifizierung 3,6% (Tab. 28B, „Gesamt“). Falsch positive Ereignisse traten mit der Ausnahme von abl-CC, BCR-



GG und BCR-GT bei allen getesteten Fragmenten auf, von denen nur die Fragmente BCR-AG (in der 2. PCR) und BCR-AC (in der Reamplifizierung) mehr als zwei solcher Ereignisse aufwiesen (Tab. 28C).

**Tab. 28** Häufigkeit fraktionsfremder Fragmente in Einfachen Fraktionen

<b>(A) Auswertung nach Fraktionen</b>								
	AA		TT		CC		GG	
2. PCR	2/57	3,5%	2/57	3,5%	3/57	5,2%	4/55	7,2%
Reamplifizierung	3/58	5,2%	0/58	0%	2/58	3,4%	3/56	5,4%
<b>(B) Auswertung nach Testsystem</b>								
	Zelllinie PT1590		Patient A		BCR-ABL Testsystem		Gesamt	
2. PCR	2/72	2,7%	6/78	7,9%	3/76	3,9%	11/226	<b>4,9%</b>
Reamplifizierung	2/72	2,7%	2/78	2,6%	4/72	5,5%	8/222	<b>3,6%</b>
<b>(C) Auswertung nach Testfragment</b>								
	Ex 8/9 AA	BCR-TT	BCR-AT	BCR-AC	BCR-AG	Ex 5/6 TC	BCR-GC	abl-CC, BCR-GG, BCR-GT
2. PCR	1/11	1/11	1/11	1/11	4/11	2/11	1/11	0/11
Reamplifizierung	0/8	0/8	1/8	3/8	1/8	1/8	2/8	0/8

### 3.2.3 Gemischte Fraktionen

Im Gegensatz zu den Einfachen Fraktionen, für deren Anreicherung aus einer Mse I-Repräsentation jeweils eine spezifische Adaptersequenz benutzt wurde, wurde bei Gemischten Fraktionen eine Kombination aus zwei Adaptersequenzen verwendet, die in den nachfolgenden Fraktionierungs-PCR als Bindestellen für zwei Primer dienten. So wie beispielsweise eine AA-Fraktion durch einen Dra I-Verdau und die Ligation von 26RAn-Adapttern und eine TT-Fraktion durch einen Vsp I-Verdau und die Ligation von 26RTn-Adapttern vorbereitet wurde, wurde eine AT-Fraktion durch die Kombination der beiden Enzymreaktionen und der beiden 26Rn-Adapter vorbereitet. Die Nomenklatur der Gemischten Fraktionen leitete sich aus der Reihenfolge ab, in der ihre Differenzierungsbasen selektiert wurden. So wurde eine TG-Fraktion zuerst mit Vsp I (AT'TAAT) behandelt und mit dem 26RTn-Adapter ligiert und dann mit Bsp TI (C'TTAAG) behandelt und mit dem 26RGn-Adapter ligiert. Bei einer GT-Fraktion wurden Enzymreaktionen und Adapterligationen in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt. Beide Reihenfolgen des sequentiellen Restriktionsverdaus wurden regelmäßig durchgeführt, um mögliche Ursachen für das Auftreten von unerwünschten Fragmenten zu detektieren.

Die Bedingungen für den Fraktionierungsverdau, die Ligation der 26Rn-Adapter, die Auffüllreaktion, das Waschen von paramagnetischen Partikeln und die Fraktionierungs-PCR wurden zu einem großen Teil aus der Etablierung der Einfachen Fraktionen für die verschiedenen Vorgehen zur Gemischten Fraktionierung übernommen. Das spezifische experimentelle Vorgehen konnte in zwei Hauptgruppen eingeteilt werden. Zum einen wurde versucht, die Gemischten Fraktionen durch eine zweifache

Positivselektion selektiv anzureichern, zum anderen, die unerwünschten Fragmente während der Anreicherung der Gemischten Fraktionen zu unterdrücken (Abb. 16).

Bei allen Versuchen ging es insbesondere darum, diejenigen einfachen Fragmente abtrennen zu können, die die gleichen Differenzierungsbasen wie die Gemischte Fraktion enthielten. Dies stellte sich bei der Mehrheit der Protokolle als schwierig dar. Zufrieden stellende Ergebnisse wurden letztlich durch ein Protokoll mit Inhibition der unerwünschten Fragmente am Einzelstrang-Adapter erreicht (3.2.3.2.2).

#### Vorgehen zur Gemischten Fraktionierung

a) durch zweifache Positivselektion	b) mit Inhibition unerwünschter Fragmente
3.2.3.1.1. mit Markierungs-PCR Protokoll A Protokoll B Protokoll C  3.2.3.1.2. mit Zwischen-PCR  3.2.3.1.3. in direkter Folge durch Denaturierung durch Verdau	3.2.3.2.1. durch Suppressions-PCR  3.2.3.2.2. am Einzelstrang-Adapter

**Abb. 16** Zur Herstellung der Gemischten Fraktionen wurden verschiedene Protokolle durchgeführt, die sich in die Hauptgruppen „Zweifache Positivselektion“ und „Inhibition unerwünschter Fragmente“ aufteilen lassen.

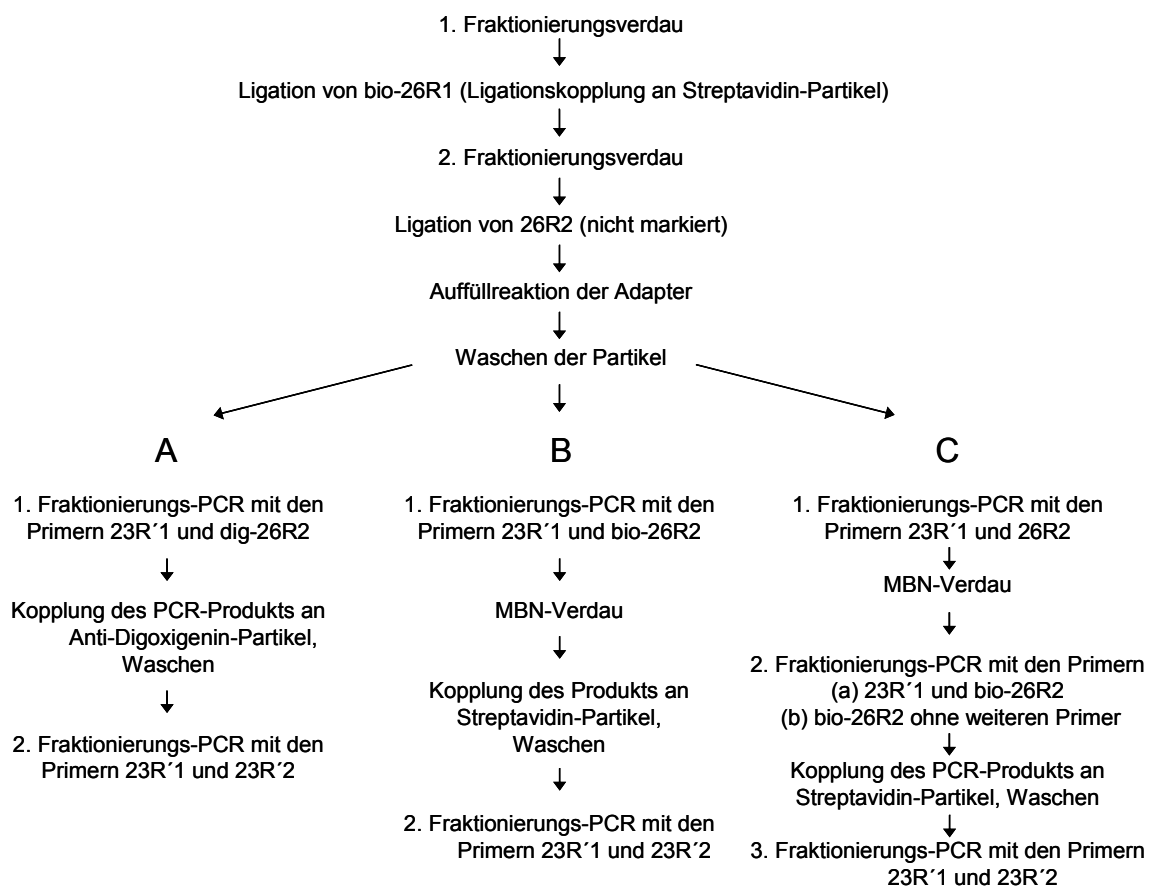
### 3.2.3.1 Gemischte Fraktionierung durch zweifache Positivselektion

Bei diesem Vorgehen sollten die Gemischten Fraktionen gewonnen werden, indem ihre Fragmente erst in Abhängigkeit von der einen Differenzierungsbase und dann in Abhängigkeit von der anderen positiv selektiert werden. Die Selektion der ersten Differenzierungsbase verlief bei diesem Vorgehen in der bereits beschriebenen Weise über einen biotinylierten 26Rn-Adpater. Die zweite Positivselektion folgte entweder über digoxigenierte Adapter (an Anti-Digoxigenin-Partikeln, Roche) oder biotinylierte Adapter (an Streptavidin-Partikeln, Dynal).

#### 3.2.3.1.1 Zweifache Positivselektion mit Markierungs-PCR

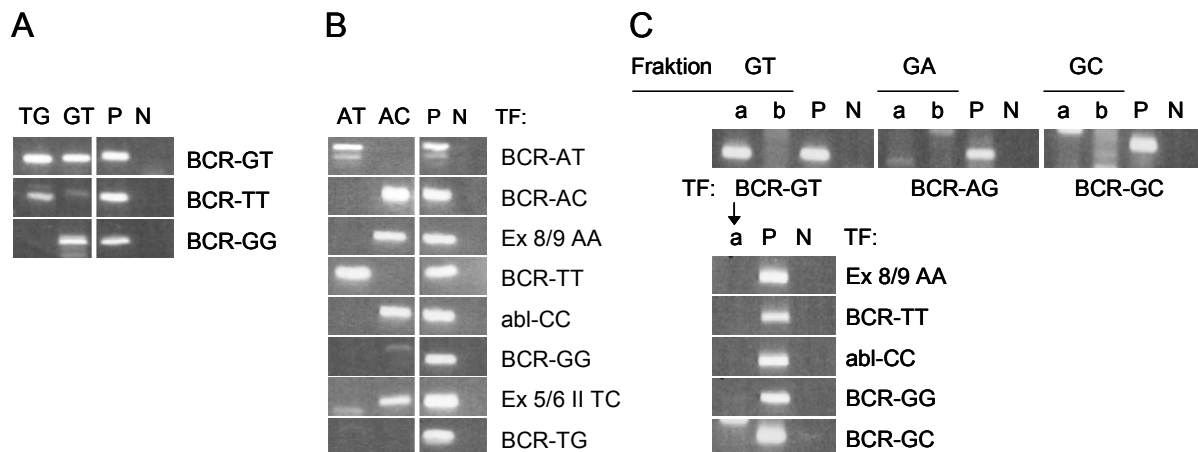
Die Protokolle für eine zweifache Positivselektion entsprachen im ersten Abschnitt dem der einfachen Positivselektion bei den Einfachen Fraktionen (siehe auch Abb. 17). Abb. 17 beschreibt drei verschiedene Vorgehensweisen (A, B oder C), mit denen im zweiten Protokollabschnitt die selektive Anreicherung einer Gemischten Fraktion erreicht werden sollte. Bei den Vorgehensweisen A und B wurde in der 1. Fraktionierungs-PCR für die Bindestelle am biotinylierten Adapter (bezeichnet mit

bio-26R1) wie gehabt ein 23R'-m-Primer verwendet, jedoch ein Biotin- oder dig-markiertes 26Rn-Oligonukleotid als Primer für die Bindestelle am nicht biotinylierten 26Rn-Adapter (26R2). Die Folge war, dass das PCR-Produkt im Überstand der Streptavidin-Partikel nun eine neue Markierung aufwies und in die zweite Positivselektion eingesetzt werden konnte. Dazu wurde es von den Streptavidin-Partikeln abgenommen, zum Teil einer MBN-Reaktion unterzogen (Vorgehensweise B), mit neuen Partikeln inkubiert, diese gewaschen und dann in die 2. Fraktionierungs-PCR eingesetzt. Bei der Vorgehensweise C wurde die zweite Positivselektion erst nach der 2. Fraktionierungs-PCR vorgenommen und eine 3. PCR angeschlossen, um die gewünschte Fraktion von den Partikeln in den Überstand zu bringen.



**Abb. 17** Schema der Gemischten Fraktionierung durch zweifache Positivselektion mit Markierungs-PCR **(A)** Vorgehen mit Anti-Digoxigenin-Partikeln **(B)** Vorgehen mit Streptavidin-Partikeln und MBN-Verdau **(C)** Vorgehen mit drei Fraktionierungs-PCR und MBN-Verdau (bio-26R1: Adapter der ersten Positivselektion, 26R2: Adapter der zweiten Positivselektion)

Eine TG- und eine GT-Fraktion wurden nach der Vorgehensweise A erst an Streptavidin- und dann an Anti-Digoxigenin-Partikeln positiv selektiert<sup>15</sup>. Die Anti-Digoxigenin-Partikel (Roche) verklumpten nach dem ersten Waschschrift bei 50°C und 50% Formamid. Dennoch waren die Fraktionen positiv für das Testfragment BCR-GT. Die einfachen Fragmente BCR-TT bzw. BCR-GG, die jeweils den biotinylierten Adapter (bio-26R1) mit der Gemischten Fraktion teilten, konnten nicht abgetrennt werden (Abb. 18A).



**Abb. 18** Gemischte Fraktionierung durch zweifache Positivselektion mit Markierungs-PCR. **(A)** Fraktionen TG und GT, die nach einer Positivselektion mittels bio-26RTn bzw. -Gn in eine Markierungs-PCR mit dig-26RGn bzw. -Tn eingesetzt wurden (nach Abb. 17A) **(B)** Fraktionen AT und AC: erste Positivselektion mittels bio-26RAn, zweite Positivselektion mittels bio-26RTn bzw. -C (nach Abb. 17B) **(C)** GT-, GA- und GC-Fraktionen, die nach einer Positivselektion mittels bio-26RGn in eine Markierungs-PCR mit bio-26RTn bzw. -An bzw. bio-26RC eingesetzt wurden (nach Abb. 17C). a: Markierungs-PCR mit 23R'Gm, b: Markierungs-PCR ohne 23R'Gm (TF: Testfragmente, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

In einem Experiment zur Fraktionierung einer AT- und einer AC-Fraktion wurden daher beide Selektionen mit biotinylierten Adaptern und Streptavidin-Partikeln sowie unter Einbeziehung eines MBN-Verdaus durchgeführt (Vorgehensweise B)<sup>16</sup>. Im Falle der AT-Fraktion konnte nur das Fragment BCR-TT (trug den 26R2-Adapter) nicht eliminiert werden. Die AC-Fraktion wies mehrere unerwünschte Fragmente auf, die entweder die Differenzierungsbasen A oder C enthielten (Abb. 18B). Um eine Verunreinigung der zweiten Positivselektion mit Partikeln aus der ersten Selektion auszuschließen, wurde die Vorgehensweise C auf die Fraktionen GT, GA und GC angewendet<sup>17</sup>.

<sup>15</sup> 1. Positivselektion: Ligationskopplung von 1 µg DNA, bio-26RTn bzw. bio-26RGn, 20 µl Streptavidin-Partikel, 1. PCR: 23R'Tm und dig-26RGn bzw. 23R'Gm und dig-26RTn, 2. Positivselektion: PCR-Produkt-Kopplung an 20 µl Anti-Dig Partikel, 2. PCR: 23R'Tm und 23R'Gm

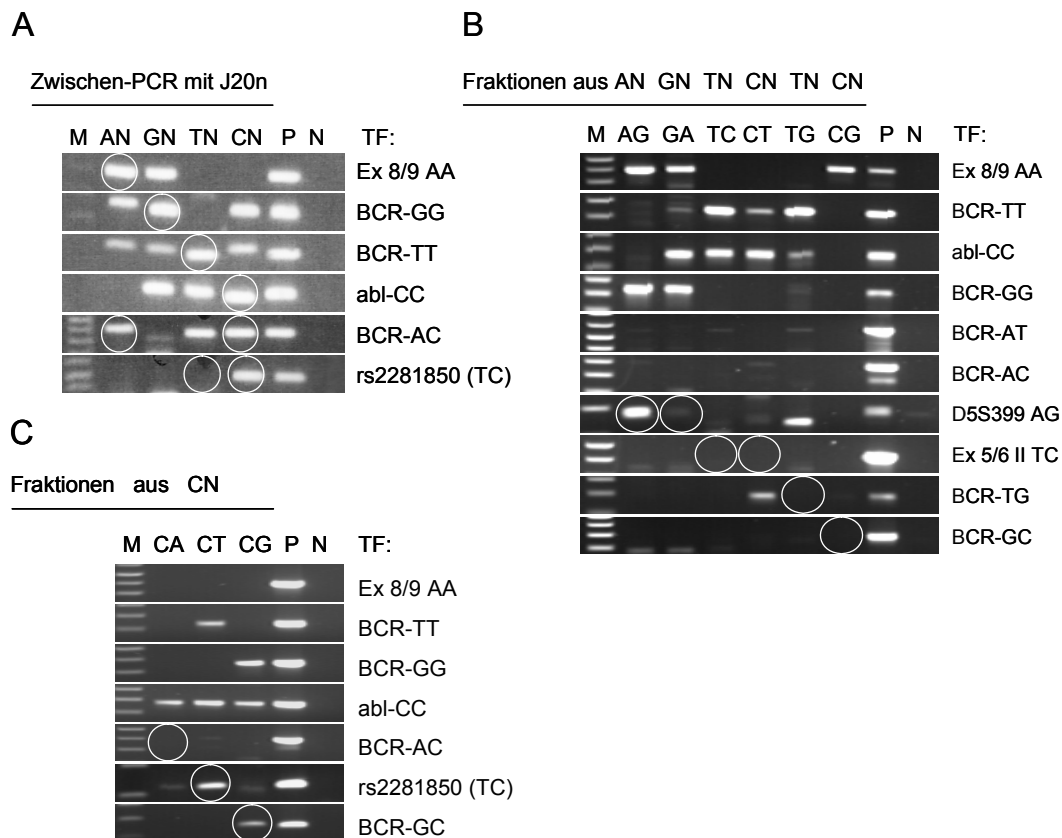
<sup>16</sup> 1. Positivselektion: Ligationskopplung von 1 µg DNA, bio-26RAn, 20 µl Streptavidin-Partikel, 1. PCR: 23R'Am und bio-26RTn bzw. bio-26RC, 2. Positivselektion: PCR-Produkt-Kopplung an 20 µl Streptavidin-Partikel, 2. PCR: 23R'Am und 23R'Tm bzw. 23R'Cm

<sup>17</sup> 1. Selektion: Ligationsk. 1 µg DNA, bio-26RGn, 20 µl Streptavidin-P., 1. PCR: 23R'Gn und 23RTn bzw. 23RAn bzw. 23RCn, MBN-Verdau, 2. PCR: 23R'Gn und bio-26RTn bzw. bio-26RAn bzw. bio-26RC, 2. Selektion: PCR-Produkt-Kopplung an 15 µl Streptavidin-Partikel, 3. PCR: 23R'Gn und 23RTn bzw. 23RAn bzw. 23RCn

Hierbei wurde getestet, ob es einen Vorteil bringt, in der Markierungs-PCR für die zweite Positivselektion, die in diesem Fall die 2. PCR darstellte, nur das biotinylierte 26R2-Oligonukleotid als Primer zu verwenden und somit ein einzelsträngiges PCR-Produkt zu gewinnen. Es konnten jedoch weder nur mit bio-26R2 (b) noch durch gleichzeitige Zugabe des 23R'Gm-Primers (a) positive GA- und GC-Fractionen hergestellt werden (Abb. 18C). Vorgehensweise C erzielte nur mit beiden Primern (a) eine positive GT-Fraktion; diese war rein in Bezug auf alle getesteten Fragmente anderer Fraktionen. Weitere Bemühungen brachten allerdings keine reproduzierbaren Ergebnisse.

### 3.2.3.1.2 Zweifache Positivselektion mit Zwischen-PCR

Dieser Ansatz sah vor, nach der ersten Positivselektion die gesamte DNA an den Partikeln ungeachtet der zweiten Differenzierungsbasen zu amplifizieren und aus dem PCR-Produkt drei Gemischte Fraktionen zu gewinnen.



**Abb. 19** Gemischte Fraktionierung durch zweifache Positivselektion und eine Zwischen-PCR **(A)** Fragmentzusammensetzung der Zwischen-PCR vor dem zweiten Fraktionierungsverdau. Die erste Positivselektion erfolgte über die Adapter bio-26RAn (AN), bio-26RGn (GN), bio-26RTn (TN), bio-26RC (CN) **(B)** Gemischte Fraktionen wurden aus dem Produkt der Zwischen-PCR aus (A) hergestellt **(C)** Fraktionen CA, CT und CG wurden aus dem Produkt einer Zwischen-PCR CN hergestellt (M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, Kreise markieren die erwarteten Banden)

Diese „Zwischen-PCR“ wurde mit einem 23R'-Primer für die Bindestelle des biotinylierten 26R1-Adapters (23R'1) und dem Primer J20n durchgeführt. Die Bezeichnung einer Zwischen-PCR war

beispielsweise AN nach einer Positivselektion über bio-26RAn, da in dem PCR-Produkt nur Fragmente mit den Differenzierungsbasen AN (N = A, T, C, G) vorhanden sein sollten. Anschließend wurde das Material auf drei verschiedene Reaktionen aufgeteilt und der 2. Fraktionierungsverdau durchgeführt, durch den die Gemischte Fraktion festgelegt wurde. Dann folgten die zweite Positivselektion (durch eine Ligationskopplung an bio-26R2-Adapter) und die Fraktionierungs-PCR<sup>18</sup>. Abb. 19A zeigt ein Ausleseverfahren von Zwischen-PCR-Produkten, die je mit einem anderen biotinylierten 26R1-Adapter hergestellt wurden. Alle von ihnen zeigten neben den erwarteten Banden (mit Kreisen markiert) auch Banden für Testfragmente, die nach der ersten Positivselektion eigentlich nicht mehr vorhanden sein sollten. Andererseits kam es auch zu Verlusten von erwarteten Testfragmenten, wie beispielsweise rs2281850 (TC) in dem Produkt TN. Gemischte Fraktionen, die aus den Produkten der Zwischen-PCR hergestellt wurden, waren größtenteils negativ für die erwünschten Fragmente, jedoch positiv für die einfachen Fragmente, die mit ihr die Differenzierungsbasen teilen (Abb. 19B). So wurde einzig in der Faktion AG ein Positivfragment nachgewiesen (D5S399 AG). Das Vorkommen der unerwünschten einfachen Fragmente konnte nicht mit der Reihenfolge der selektierten Differenzierungsbasen korreliert werden, wie an den Fraktionen AG/GA und TC/CT deutlich wird. Ein weiteres Experiment zur Fraktionierung der Fraktionen CA, CT und CG aus einer Zwischen-PCR (CN) bestätigt diese Ergebnisse: In den positiven Fraktionen CT und CG wurden die Testfragmente abl-CC und BCR-TT bzw. BCR-GG nachgewiesen (Abb. 19C). Keines der bisher beschriebenen Protokolle war in der Lage, einfache Fragmente zuverlässig aus den Gemischten Fraktionen abzutrennen, was auf die Amplifikation der unerwünschten Fragmente zu einem frühen Zeitpunkt des Protokolls – sei es durch eine Markierungs- oder eine Zwischen-PCR – zurückgeführt wurde.

### ***3.2.3.1.3 Zweifache Positivselektion in direkter Folge***

Da eine Amplifikation nach der ersten Positivselektion offenbar dazu führte, dass unerwünschte einfache Fragmente im Folgenden nicht mehr abgetrennt werden konnten, sollte eine zweifache Positivselektion der Zielfragmente erreicht werden, ohne sie zwischendurch zu amplifizieren. Dazu wurden sie nach der ersten Positivselektion wieder von den Streptavidin-Partikeln abgelöst und mit Anti-Digoxigenin-Partikeln inkubiert. Für dieses Vorgehen wurden zunächst ein biotinylierter 26R1-Adapter und ein Digoxigenin-markierter 26R2-Adapter an die vorbereiteten Fragmente ligiert. Um diese nach der ersten Positivselektion wieder in Lösung zu bringen, wurden sie zum einen einem Denaturierungsschritt und zum anderen einem erneuten Restriktionsverdau unterzogen.

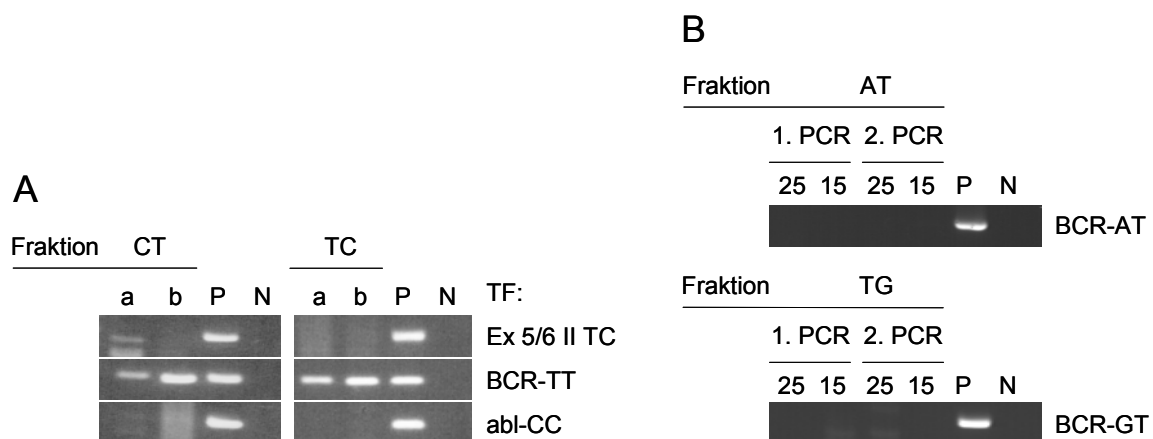
Durch einen Denaturierungsschritt der DNA an den Streptavidin-Partikeln von 5 min bei 95°C sollten die Gegenstränge der gebundenen Fragmente in Lösung gebracht werden, um mit dem Überstand abgenommen und daraufhin mit Anti-Digoxigenin-Partikeln inkubiert werden zu können. Die

---

<sup>18</sup> 1. Positivselektion: Ligationskopplung von 250 ng DNA, bio-26Rn-Adapter, 10 µl Streptavidin-Partikel, Zwischen-PCR: 23R'n Primer und J20n, 2. Fraktionierungsverdau, 2. Positivselektion: Ligationskopplung von 350 ng DNA, bio-26Rn-Adapter, 10 µl Streptavidin-Partikel, 2. PCR: 23R'n Primer

Fraktionierungs-PCR erfolgte demnach mit einzelsträngigen DNA-Fragmenten. Dies wurde mit Proben der Zelllinie PT1590 zur Herstellung der Fraktionen CT und TC ausprobiert<sup>19</sup>. Aus Abb. 20A wird deutlich, dass auf diese Art und Weise keine Fraktionen hergestellt werden konnten, die das Positivfragment Ex 5/6 TC enthielten, aber dennoch positiv für das unerwünschte Fragment BCR-TT waren. Dies war unabhängig davon, welche Differenzierungsbase zuerst selektiert worden war.

Anstelle des Denaturierungsschrittes wurde versucht, die Fragmente nach der ersten Positivselektion durch einen erneuten Fraktionierungsverdau wieder von den Partikeln abzutrennen. Darauf folgten die erneute Ligation des entsprechenden 26R1-Adapters und die Anreicherung der Fragmente. AT- und TG-Fraktionen, die auf diese Art und Weise behandelt worden waren<sup>20</sup>, zeigten keine Anreicherung von erwünschten Fragmenten (Abb. 20B). Eine spezifische Kontroll-PCR zeigte weder nach 25 bzw. 15 Zyklen der 1. Fraktionierungs-PCR, noch nach der 2. PCR einen positiven Nachweis der Fragmente BCR-AT bzw. BCR-GT in diesen Fraktionen. Keiner der beiden Ansätze führte zu der Etablierung eines Protokolls, mit dem die Gemischten Fraktionen positiv und rein angereichert werden konnten.



**Abb. 20** Gemischte Fraktionierung durch zweifache Positivselektion in direkter Folge. **(A)** Fraktionierung mit Denaturierungsschritt der DNA nach der ersten Positivselektion. a: Tester-, b: Driverpool PT1590 **(B)** Fraktionierung des Driverpools PT1590 mit erneutem Restriktionsverdau der DNA nach der ersten Positivselektion. Nachweis von Positivfragmenten nach der 1. PCR (mit 25 bzw. 15 Zyklen) und der 2. PCR (TF: Testfragment, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

<sup>19</sup> 1. Positivselektion: Ligationskopplung von 1 µg DNA, bio-26Rn-Adapter, 20 µl Streptavidin-Partikel, 2. Fraktionierungsverdau, Quick Ligation des 2. Adapters: dig-26Rn, Auffüllreaktion, Denaturierung 5' bei 95°C, 2. Positivselektion: Inkubation mit 20 µl Anti-Dig-Partikeln, 1. PCR: 23R'n Primer, MBN-Verdau, 2. PCR: 23R'n Primer

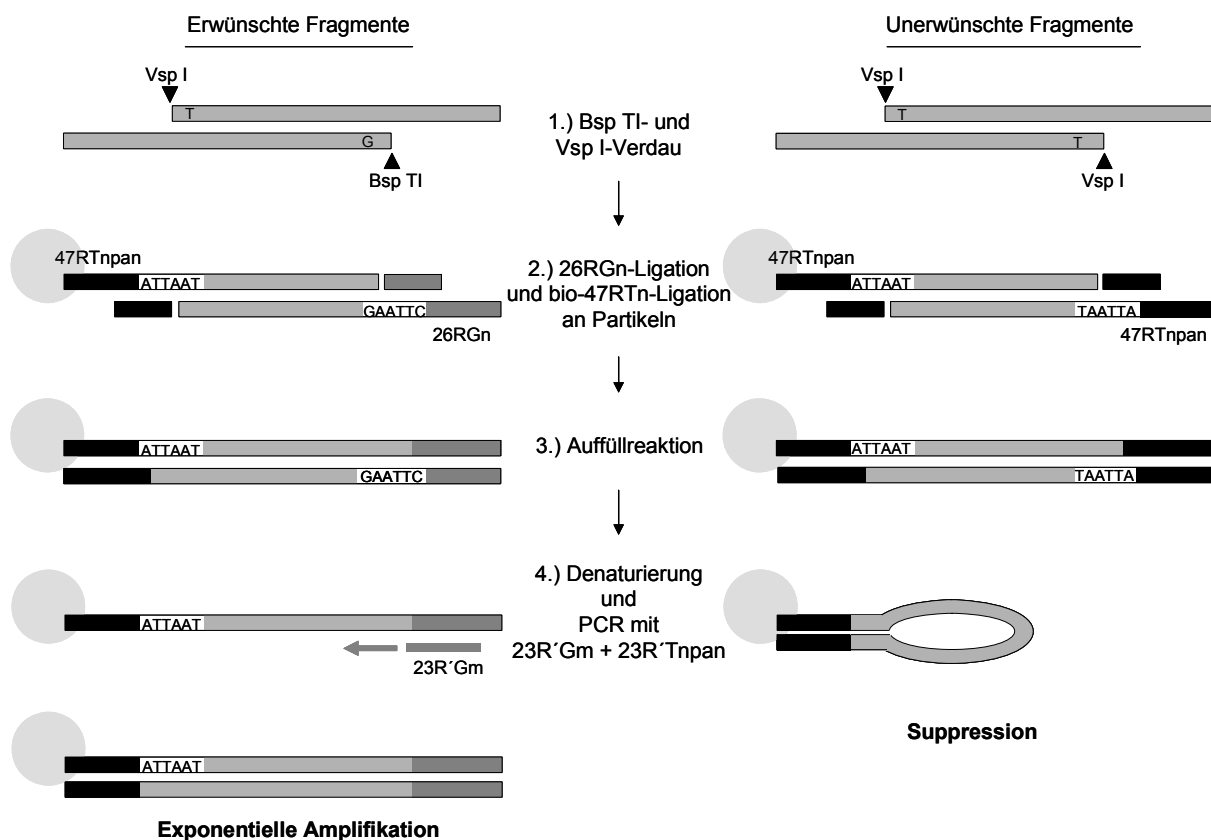
<sup>20</sup> 1. Positivselektion: Ligationskopplung von 1 µg DNA, bio-26Rn-Adapter, 20 µl Streptavidin-Partikel, 2. Fraktionierungsverdau, Quick Ligation des 2. Adapters: dig-26Rn, Auffüllreaktion, Wiederholung des 1. Fraktionierungsverdaus, 2. Positivselektion: Inkubation mit 20 µl Anti-Dig-Partikeln, Quick Ligation des 1. Adapters: 26Rn; 1. PCR: 23R'n Primer, MBN-Verdau, 2. PCR: 23R'n Primer

### 3.2.3.2 Gemischte Fraktionierung mit Inhibition

Die unerwünschten einfachen Fraktionen konnten offenbar nicht mehr aus den Gemischten Fraktionen abgetrennt werden, wenn sie irgendeine Art der Amplifikation zu Beginn des Fraktionierungsprotokolls erfahren hatten. Daher sah ein weiterer Lösungsansatz zur Fraktionierung der Gemischten Fraktionen vor, die Amplifikation der einfachen Fraktionen während der Fraktionierungs-PCR zu unterdrücken.

#### 3.2.3.2.1 Suppressions-PCR

Bei diesem Vorgehen, das zuerst von Siebert et al. beschrieben wurde, werden DNA-Fragmente mit zwei identischen Adaptern in einer PCR nicht amplifiziert, da diese während der Annealing-Phase in einer Pfannenstielstruktur hybridisieren (*self-annealing*) und daher nicht für eine Primerbindung zugänglich sind (Siebert, Chenkchik et al. 1995).



**Abb. 21** Gemischte Fraktionierung durch Suppressions-PCR am Beispiel einer GT-Fraktion. Schematische Darstellung eines erwünschten GT-Fragmentes und eines unerwünschten TT-Fragments im Verlauf des Protokolls: **(1.)** Restriktionsverdau mit Bsp TI und Vsp I (nacheinander) **(2.)** Ligation der 26RGn- (dunkelgrau) und der biotinylierten 47RTn-Adapter (schwarz, nacheinander) und Positivselektion an paramagnetischen Partikeln **(3.)** Auffüllreaktion **(4.)** Waschen der Partikel unter denaturierenden Bedingungen mit anschließender Fraktionierungs-PCR mit den Primern 23R'Tnpan und 23R'Gm



Ein *self-annealing* findet generell zwischen gleichen Adaptersequenzen einzelsträngiger Fragmente statt und kann bei ausreichender Länge an Übereinstimmung auch bei Temperaturen von 68°C, wie sie während der Elongationsphase herrschen, aufrecht erhalten werden. Die Primerbindestellen an Fragmenten mit verschiedenen Adaptoren bleiben zugänglich, weil diese auf Grund ihrer Sequenzunterschiede nicht miteinander hybridisieren. Dieser Umstand sollte, wie in Abb. 21 schematisch dargestellt, für die selektive Anreicherung der Gemischten Fraktionen genutzt werden.

Anstelle des bisher verwendeten bio-26RTn-Adapters wurde ein biotinylierter Oligonukleotid-Adapter von 47 Basen (bio47RTnpan) verwendet, für den die 26RTn-Sequenz um eine GC-reiche Sequenz von 21 Basen am 3'-Ende verlängert worden war. Die Fraktionierungsprimer für diesen *clamp*-Adapter wurden nach der Länge ihrer Sequenz mit 23R'npan und 18R'npan bezeichnet (Tab. 29).

**Tab. 29** Sequenzen *clamp*-Adapter, langes Oligonukleotid (5'→3')

47RTnpan	<b>GTA TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AGG</b> TCG CGT GGT GCG GAG GGC AT
23R'Tnpan	TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AG
18R'Tnpan	TAG TCT CGG CTC AAC GTC

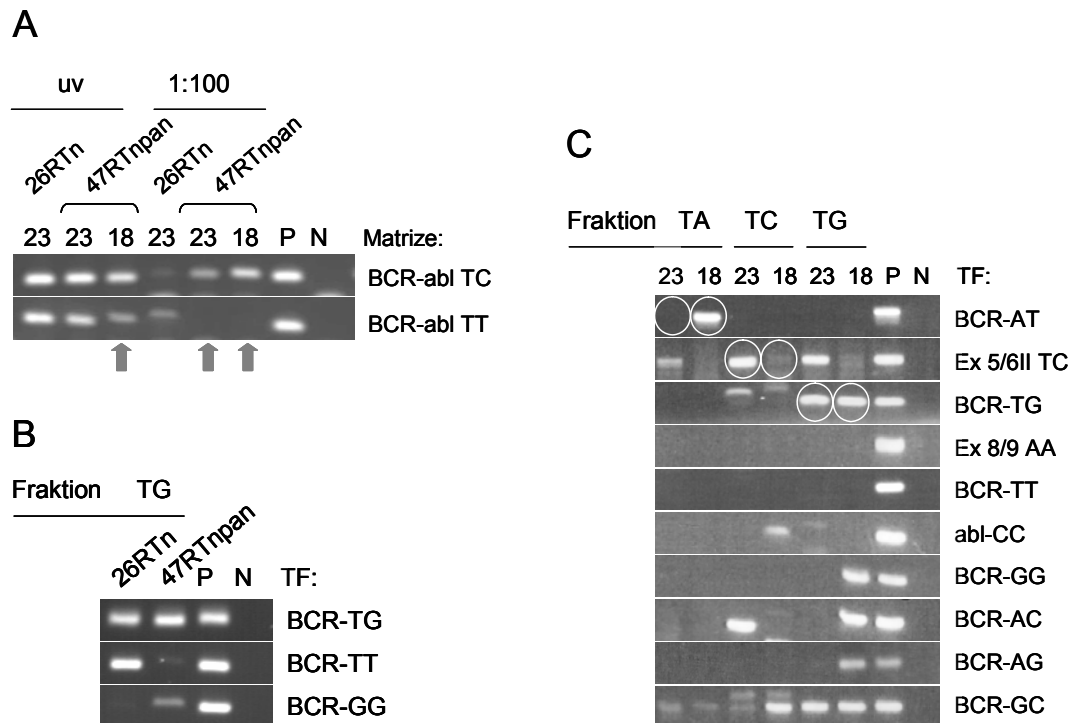
**fett kursiv.** 26RTn-Sequenz

Zunächst wurde untersucht, ob eine Suppression eines einzelnen Mse I-Fragmentes durch den langen Adapter 47RTnpan erreicht werden kann. Dazu wurden die isoliert vorliegenden Mse I-Fragmente BCR-ABL TT und BCR-ABL TC mit 47RTnpan bzw. 47RTnpan/26RC ligiert und nach einer Auffüllreaktion durch die entsprechenden Fraktionierungsprimer (23R'Tnpan bzw. 18R'Tnpan und 23R'Cm) amplifiziert (1. Fraktionierungs-PCR). Diese PCR-Produkte wurden nach einem MBN-Verdau als DNA-Matrizen in eine spezifische Kontroll-PCR mit dem Primerpaar K562 eingesetzt und anschließend die Bandenstärke ihrer Produkte auf einem Agarosegel verglichen. Als Kontrolle dienten BCR-ABL TT- bzw. TC-Fragmente, an die 26RTn bzw. 26RTn/26RC Adapter ligiert wurden und die analog behandelt wurden<sup>21</sup>.

Das Produkt des MBN-Verdaus wurde unverdünnt (uv) und in einer 1:100 Verdünnung in die Kontroll-PCR eingesetzt (Abb. 22A). In beiden Fällen war eine Suppression des BCR-ABL TT-Fragments durch den 47RTnpan-Adapter zu erkennen (Pfeile): im Vergleich zu der Kontroll-Fragmenten mit 26RTn-Adaptoren zeigten sie schwächere Banden des spezifischen PCR-Produkts. Dieser Effekt konnte sowohl mit 23R'Tnpan als auch mit 18R'Tnpan erreicht werden, wie an den Proben der 1:100 Verdünnung deutlich wird. Die Amplifikation des BCR-ABL TC Fragments wurde unter identischen Bedingungen nicht durch die Verlängerung des Adapters beeinflusst.

<sup>21</sup> 90 ng BCR-ABL Fragment TT bzw. TC aus einem Vsp I-Verdau wurden mit 47RTnpan ligiert (Standardligation), über eine Microcon-Y30 Säule gereinigt und mit Ksp AI inkubiert. Es folgte eine Quick Ligation von bio-26RC an Streptavidin-Partikeln mit Auffüllreaktion und Waschen der Partikel. 1. PCR: T<sub>anneal</sub> 57°C, 20 Zyklen, Primer 23R'Cm und 23R'Tnpan bzw. 18R'Tnpan. Für die Kontrolle wurden die Fragmente analog behandelt, aber mit 26RTn ligiert und mit 23R'Cm und 23R'Tm amplifiziert. Dann folgte ein MBN-Verdau von allen Proben.

Anschließend wurden zwei TG-Fractionen mit den Adaptoren bio-26RTn bzw. bio-47RTn und 26RGn nach dem oben dargestellten Verfahren hergestellt<sup>22</sup> (Fraktionierungsprimer 23R'Tnpan und 23R'Gm).



**Abb. 22** Gemischte Fraktionierung durch Suppressions-PCR. **(A)** Kontroll-PCR (K562) auf eine Amplifikation (unverdünt bzw. 1 :100) der Mse I-Fragmente BCR-ABL-TT und -TC mit den Adaptoren bio-26RTn bzw. bio-47RTnpan **(B)** TG-Fractionen nach Positivselektion über bio-26RTn bzw. bio-47RTnpan **(C)** Vergleich der Fraktionierungsprimer 23R'Tnpan und 18R'Tnpan bei der Herstellung der Fraktionen TA, TC und TG nach einer Positivselektion über bio-47RTnpan (M: Marker; P: Positivkontrolle; N: Negativkontrolle; Pfeile indizieren Suppression; 23 bzw. 18: Länge der Fraktionierungsprimer in bp)

Während in beiden Fraktionen das Fragment BCR-GT nachgewiesen wurde, konnte die Anreicherung des BCR-ABL TT Fragments durch den verlängerten Adapter unterdrückt werden (Abb. 22B). In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss der Fraktionierungsprimer 23R'Tnpan und 18R'Tnpan auf die Fraktionen TA, TC und TG untersucht<sup>23</sup>. Obgleich in allen Fällen die Amplifikation des unerwünschten Fragments BCR-TT supprimiert wurde, konnte bei keiner der Fraktionen ein zufrieden stellendes Ergebnis erzielt werden: Im Falle der TA-Fractionen führte 23R'Tnpan zum Verlust des Positivfragments BCR-AT, im Gegensatz dazu führte 18R'Tnpan zum Verlust von Ex 5/6II TC in der TC-Fraktion. Drei von vier positiven Fraktionen wiesen zusätzlich eines bzw. mehrere unerwünschte

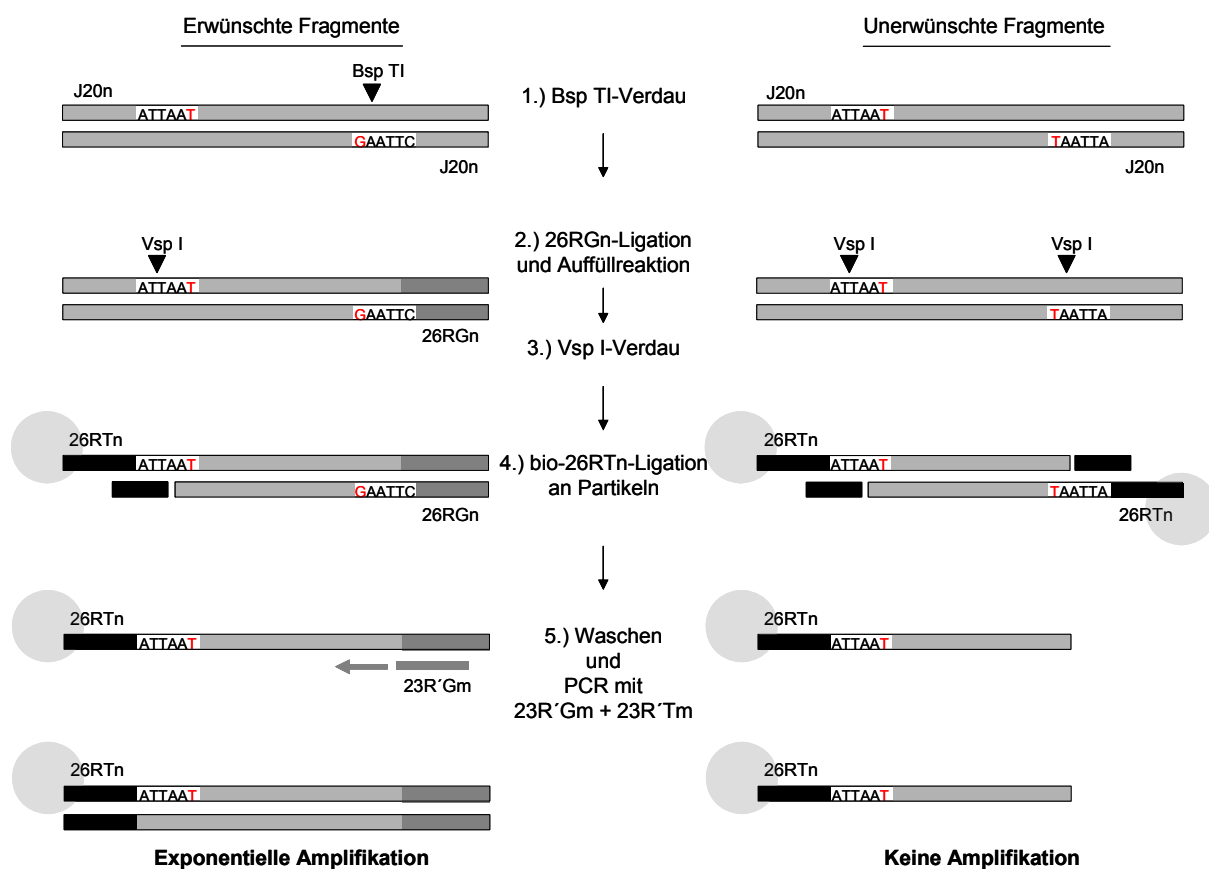
<sup>22</sup> Ligationskopplung von 1 µg DNA mit bio-47RTnpan bzw. bio-26RTn, 2. Verdau mit Bsp TI, Quick Ligation des 2. Adapters 26RGn, Auffüllreaktion und Waschen der Partikel. 1. PCR: Primer 23R'Tnpan bzw. 23R'Tn und 23R'Gn, MBN-Verdau, 1. PCR: Primer 23R'Tnpan bzw. 23R'Tn und 23R'Gn

<sup>23</sup> Ligationskopplung von 1 µg DNA mit bio-47RTnpan, 2. Verdau, Quick Ligation des 2. Adapters 26Rn, Auffüllreaktion und Waschen der Partikel. 1. PCR: Primer 23R'Tnpan bzw. 18R'Tnpan und 23R'n, MBN-Verdau, 1. PCR: Primer 23R'Tnpan bzw. 18R'Tnpan und 23R'n

Fragmente auf (Abb. 22C). Der beobachtete Effekt der Suppression konnte mit Ausnahme dieser zwei Experimente nicht reproduzierbar erzielt werden, weshalb ein neuer Lösungsansatz zur Gemischten Fraktionierung entwickelt wurde (s. u.).

### 3.2.3.2 Gemischte Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter

Eine Auffüllreaktion von ligierten Oligonukleotid-Adaptoren synthetisiert die Gegenstränge zu den langen Oligonukleotiden und generiert damit die Bindestellen für PCR-Primer. Daher bedeutet ein Auslassen der Auffüllreaktion, dass die Amplifikation über einen Oligonukleotid-Adapter nicht möglich ist.



**Abb. 23** Gemischte Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter am Beispiel einer GT-Fraktion. Schematische Darstellung eines erwünschten GT-Fragmentes und eines unerwünschten TT-Fragments im Verlauf des Protokolls: **(1.)** 1. Fraktionierungsverdau mit Bsp TI **(2.)** Ligation des 26R1-Adapters (26RGn, dunkelgrau) und seine Auffüllreaktion **(3.)** 2. Fraktionierungsverdau mit Vsp I **(4.)** Ligation des bio-26R2-Adapters (bio-26RTn, schwarz) an paramagnetischen Partikeln (beachte nicht-kovalent gebundenes kurzes Oligonukleotid) **(5.)** Waschen der Partikel (unter denaturierenden Bedingungen, später unter nicht denaturierenden Bedingungen, s. u.) und Fraktionierungs-PCR mit den Primern 23R'Tm und 23R'Gm

Um die Amplifikation von einfachen Fragmenten in einer Gemischten Fraktion zu unterdrücken, wurde die Auffüllreaktion des biotinylierten Adapters bewusst ausgelassen. Bei diesem Vorgehen wurde nach dem 1. Fraktionierungsverdau ein nicht markierter 26R1-Adapter an die Zielfragmente

ligiert, diese einer Auffüllreaktion unterzogen und dann dem 2. Fraktionierungsverdau zugeführt. Es folgte eine Ligationskopplung der Fragmente, indem sie an biotinylierte 26R2-Adapter auf der Oberfläche von Streptavidin-Partikeln ligiert wurden. Ohne eine weitere Auffüllreaktion wurden die Partikel daraufhin gewaschen und dann in die 1. Fraktionierungs-PCR eingesetzt (siehe Schema in Abb. 23).

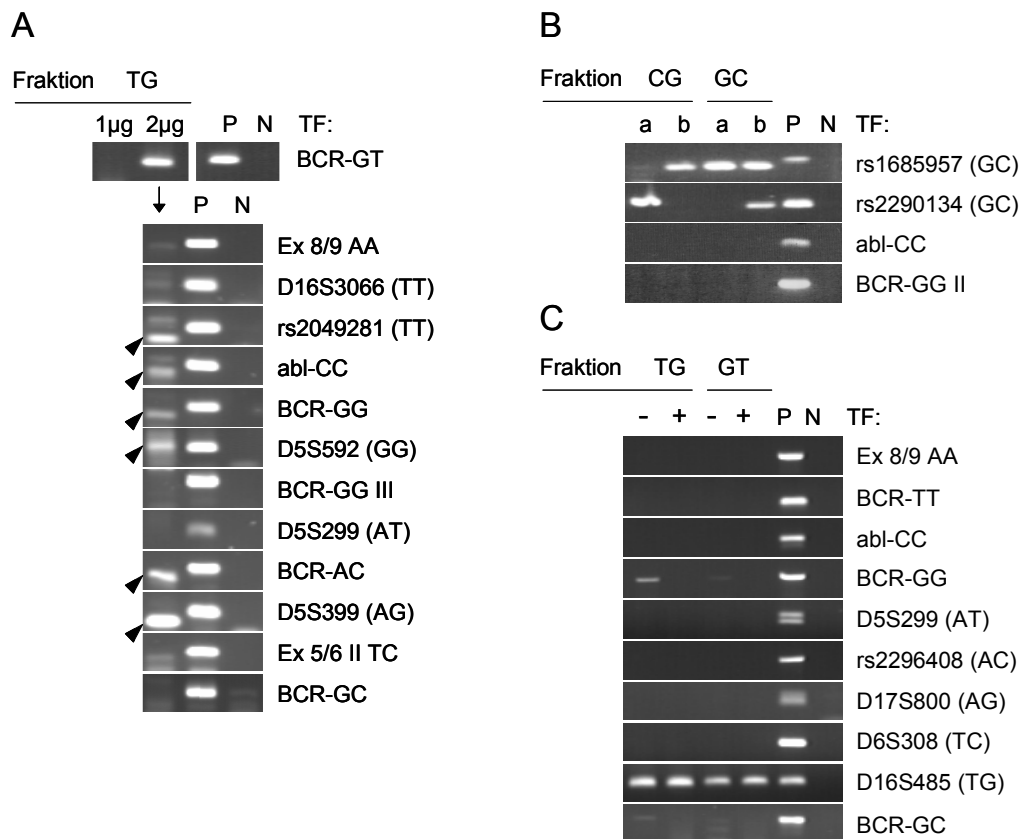
Bei diesem Verfahren konnten die gewünschten Fragmente von der Bindestelle des nicht-markierten Adapters aus elongiert werden. Dabei wurde auf dem neu synthetisierten Strang die Bindestelle für den 23R'2-Primer generiert. Somit wurde eine exponentielle Amplifikation der gewünschten gemischten Fragmente nach einem Zyklus möglich. Unerwünschte Fragmente aus einer Einfachen und zwei Gemischten Fraktionen waren zwar über bio-26R2 positiv selektiert worden, trugen aber keine Bindestellen für die 23R'2-Primer und konnten daher nicht amplifiziert werden.

Es wurde untersucht, wie sich das gezielte Auslassen einer Auffüllreaktion des biotinylierten Adapters auf die Reinheit der Gemischten Fraktionen auswirkt. Abb. 24A zeigt TG-Fractionen, für die 1 µg bzw. 2 µg DNA aus dem 2. Fraktionierungsverdau an biotinylierte 26RGn-Adapter auf der Oberfläche von Streptavidin-Partikeln von Dynal ligiert wurden, welche anschließend unter denaturierenden Bedingungen gemäß 2.10.2.2 gewaschen wurden<sup>24</sup>. Nur die Fraktion, die aus 2 µg DNA gewonnen wurde war positiv für das Fragment BCR-GT. Die anderen Testfragmente des Ausleseverfahrens wurden in der Fraktion nicht nachgewiesen, allerdings gab es eine Reihe von Banden, die den Gesamteindruck von der Reinheit der Fraktion beeinträchtigten (Abb. 24A, Pfeilspitzen).

Daher wurde untersucht, wie sich eine verzögerte Zugabe des 23R'2-Primers (für die Bindestelle des biotinylierten Adapters) in die 1. Fraktionierungs-PCR auf die Reinheit von CG- und GC-Fractionen auswirkt. Dazu wurden sie in beschriebener Weise vorbereitet. Der 23R'2-Primer (CG: 23R'Gm; GC: 23R'Cm) wurde der 1. Fraktionierungs-PCR entweder vor dem 6. Zyklus (Abb. 24B, a) oder – wie bisher – vor dem 1. Zyklus (Abb. 24B, b) zugesetzt und anschließend die Fraktionierung weitergeführt<sup>25</sup>.

<sup>24</sup> 1. Fraktionierungsverdau mit Vsp I, Standardligation 1. Adapter: 26RTn, Auffüllreaktion, 2. Verdau mit Bsp TI, Ligationskopplung von 1 bzw. 2 µg DNA mit bio-26RGn, 1. PCR mit 23R'm Primern, MBN-Verdau, 2. PCR mit 23R'm Primern

<sup>25</sup> Je 40 µl Dynal Streptavidin-Partikel wurden mit bio-26RGn (TG, CG) bzw. bio-26RC (GC) gekoppelt, je 1 µg DNA aus 2. Fraktionierungsverdau (Bsp TI →TG; Bsp TI →CG; Ksp AI →GC) quick ligiert und die Partikel gewaschen. 1. PCR: 20 Zyklen, T<sub>anneal</sub> 59°C, Primer: 23R'm. Gleichzeitige Zugabe beider Primer vor dem 1. Zyklus oder verzögerter Zugabe von 23R'Gm (TG) bzw. 23R'Gm (CG) bzw. 23R'Cm (GC) im 5. Zyklus während der Elongationsphase. MBN-Verdau und 2. PCR mit 23R'm Primern.



**Abb. 24** Gemischte Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter. **(A)** Fraktionen TG aus 1 µg bzw. 2 µg DNA mit Zugabe des 23R'2-Primers (23R'Gm) und 20 Zyklen in der 1. Fraktionierungs-PCR **(B)** Fraktionen CG/GC mit Zugabe des 23R'2-Primers (CG: 23R'Gm; GC: 23R'Cm) vor dem 6. Zyklus (a) bzw. vor dem 1. Zyklus (b) der 1. Fraktionierungs-PCR (beide aus 1 µg DNA hergestellt) **(C)** Fraktionen TG/GT (Zugabe des 23R'2-Primers vor dem 1. Zyklus) ohne MBN-Verdau (-) bzw. mit MBN-Verdau (+) zwischen den Fraktionierungs-PCR (M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

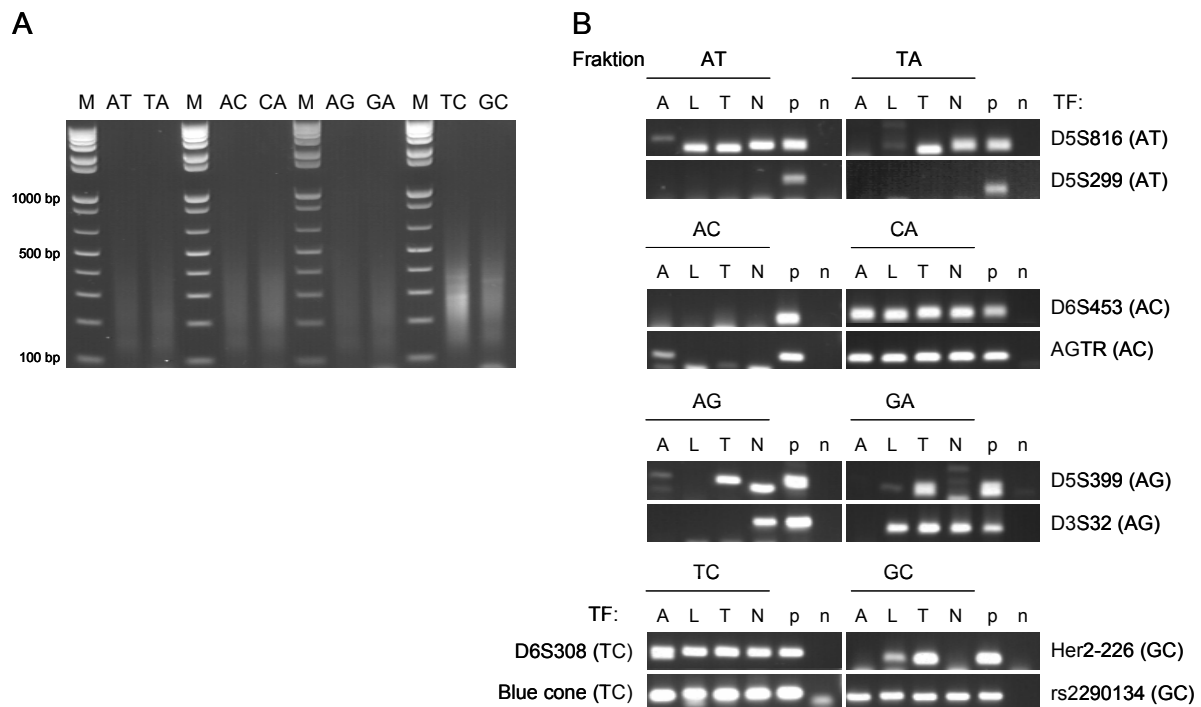
In den Fraktionen wurden in beiden Fällen Positivfragmente angereichert bzw. abgereichert und die unerwünschten einfachen Fragmente BCR-GG bzw. abl-CC abgetrennt (Abb. 24B). Es war kein Vorteil des einen oder anderen Vorgehens erkennbar.

Um dem Verlust von Positivfragmenten vorzubeugen, wurden die Streptavidin-Partikel von Dynal durch Streptavidin-Partikel von Roche ersetzt, die nach Herstellerangaben mit relativ milden Waschpuffern gewaschen werden können (2.10.2.2). Abb. 24C zeigt die Fraktionen TG/GT, für die 1 µg DNA an Partikel von Roche gekoppelt wurde und diese – ohne Auffüllreaktion des biotinylierten Adapters – unter nicht-denaturierenden Bedingungen gewaschen wurden. Dabei wurden Fraktionen miteinander verglichen, die zwischen den Fraktionierungs-PCR mit bzw. ohne MBN-Verdau behandelt worden waren<sup>26</sup>. Die Fraktionen waren alle positiv für das Testfragment D16S485 (TG) und rein in Bezug auf die anderen Testfragmente. Einzig eine schmale Bande für das Testfragment BCR-

<sup>26</sup> 1. Fraktionierungsverdau, Standardligation 26Rn-Adapter, Auffüllreaktion, 2. Verdau, Ligationskopplung von 1 µg DNA mit bio-26Rn an 40 µl Roche Streptavidin-Partikeln, 1. PCR mit 23R'm Primern, mit bzw. ohne MBN-Verdau, 2. PCR mit 23R'm Primern

GG war in der TG-Fraktion ohne MBN-Verdau zu erkennen. Diese entstand höchst wahrscheinlich durch eine unerwünschte Auffüllreaktion des bio-26TGn-Adapters während der ersten Heizphase des Thermocyclers.

Um eine solche Auffüllreaktion zu verhindern, wurde die Gemischte Fraktionierung mit einem *Hot Start* der 1. PCR begonnen, bei dem die Polymerase erst nach einem initialen Denaturierungsschritt bei einer Temperatur von 80°C in den Reaktionsansatz gegeben wurde. Aus den Tester- und Driverpools von Patient A (Tester: A, Driver: L) und der Zelllinie PT1590 (Tester: T, Driver: N) wurden die Fraktionen AT/TA, AC/CA, AG/GA sowie TC und GC mit dem Protokoll zur Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter und einem *Hot Start* aber ohne MBN-Verdau hergestellt<sup>27</sup> und analysiert.



**Abb. 25** Gemischte Fraktionierung am Einzelstrang-Adapter. **(A)** Zur Beurteilung der Fragmentverteilung in den Fraktionen wurden jeweils 25 µl (AT, AC, AG) bzw. 8 µl Probe (TA, CA, GA, TC und GC) in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt **(B)** Ausleseverfahren von je zwei Positivfragmenten in den Fraktionen aus (A) (M: Marker, A: Testerpool, L: Driverpool des Patienten A; T: Testerpool, N: Driverpool PT1590; p: Positivkontrolle, n: Negativkontrolle)

Zur Beurteilung ihrer Fragmentverteilung wurden je 8 µl der Fraktionen auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. Auf diesem war bei den Fraktionen AT, AC und AG zunächst keine DNA detektierbar, weshalb nun 25 µl von diesen Fraktionen (8 µl der anderen) aufgetragen wurden (Abb. 25A). Die Fragmentverteilung der Fraktionen erstreckte sich über die erwartete Bandbreite, Fraktionen

<sup>27</sup> 1. Verdau, Standardligation 26Rn-Adapter, Auffüllreaktion, 2. Verdau, Ligationskopplung von 1 µg DNA mit bio-26Rn an 40 µl Roche Streptavidin-Partikeln, 1. PCR mit 23R'm Primern und Hot Start, 2. PCR mit 23R'm Primern

TC und GC zeigten schwache aber distinkte Banden zwischen ca. 300 und 400 bp. Ein Ausleseverfahren zeigte Verluste von Positivfragmenten, besonders in den Fraktionen AT, AC und AG (Abb. 25B). Dies könnte evt. auf einen unvollständigen Dra I-Verdau zurückzuführen sein. Fraktionen, in denen keins von zwei getesteten Positivfragmenten nachgewiesen wurde, entfielen zu 50% auf die Proben A (Testerpool des Patienten A) und ca. 30% auf die Proben L (Driverpool des Patienten A).

### 3.2.4 Überblick und Reproduzierbarkeit (Gemischte Fraktionen)

Um die Reinheit der Gemischten Fraktionen zu analysieren, wurden die oben gezeigten Fraktionen und weitere TG- und GT-Fraktionen der Zelllinie PT1590 und des Patienten A, sowie AT- und GT-Fraktionen des Testsystems GFPmut II einem Auswerteverfahren für fraktionsfremde Fragmente unterzogen. Von 48 Fraktionen wurden 37 in die Auswertung eingeschlossen, in denen mindestens 50% der getesteten Positivfragmente nachgewiesen wurden. Die Auswertung unterscheidet zwischen falsch positiven einfachen Testfragmenten (EF), die über den biotinylierten Adapter selektiert worden waren („EF mit bio-26R2“) und anderen Ereignissen („andere TF“) und wurde sowohl getrennt nach Fraktionen (Tab. 28A), Testsystemen (Tab. 28B) und Testfragmenten (Tab. 28C) aufgeschlüsselt.

**Tab. 30** Häufigkeit fraktionsfremder Fragmente in den Gemischten Fraktionen (2. PCR)

(A) Auswertung nach Fraktion									
	AT	TA	CA	AG	GA	TC	TG	GT	GC
EF mit bio-26R2	1/36 (2,8%)	0/2	1/4 (25%)	0/2	0/3	0/4	1/4 (25%)	1/28 (3,6%)	1/4 (25%)
andere TF	0/13	0/6	6/12 (50%)	0/6	1/9 (11%)	1/12 (8,3%)	0/36	1/27 (3,7%)	0/12
(B) Auswertung nach Testsystem									
	Zelllinie PT1590		Patient A		GFPmut II		Gesamt		
EF mit bio-26R2	1/18	5,6%	2/12	16,7%	2/57	3,5%	5/87	5,7%	
andere TF	6/72	8,3%	3/54	5,6%	0/7	0%	9/133	6,8%	
(C) Auswertung nach Testfragment									
	abl-CC	BCR-GG	D6S308 TC	Ex 8/9 AA	rs37621 71 TT	D6S314 TT			
EF mit bio-26R2	1/5	1/5	-	1/5	1/5	1/5			
andere TF (davon Fragmente mit 26R1)	4/9 (4/4)	4/9 (1/4)	1/9 (0/1)						

Das Vorkommen der Fragmente „EF mit bio-26R2“ lag in den meisten Fraktionen zwischen 0 – 3,6%, in den Fraktionen CA, TG, GC allerdings bei 25% (1/4), was den niedrigen Fallzahlen zugeschrieben

wurde. Während „andere Testfragmente“ in den Fraktionen selten auftraten (0 – 11%), konnten aus der CA-Fraktion 50% (6/12) dieser Fragmente nicht abgetrennt werden (Tab. 28A). In Fraktionen der Zelllinie PT1590 lag der Anteil an unerwünschten Ereignissen bei 5,6% („EF mit bio26R2“) und 8,3% („andere TF“), in Fraktionen des Patienten A bei 16,7 bzw. 5,6% und in den Fraktionen des Testsystems GFPmut II bei 3,5 bzw. 0%. Im Durchschnitt lag der Anteil an unerwünschten Fragmenten in den untersuchten Fraktionen bei 5,7% für „EF mit bio-26R2“ bzw. 6,8% für „andere TF“. Zählt man diese zusammen, so ergibt sich eine Gesamtfehlerrate von 6,4% nach der 2. Fraktionierungs-PCR der Gemischten Fraktionen. Dieser Wert liegt in einem vergleichbaren Bereich wie der für die Einfachen Fraktionen ermittelte Wert von 4,9% (Tab. 28B).

Um zu testen, ob es eine Häufung von falsch positiven Testfragmenten mit einer bestimmten Differenzierungsbasenkombination gab, wurde eine Auswertung der Daten nach Testfragmenten vorgenommen (Tab. 28C). In der Gruppe „EF mit bio-26R2“ waren je einmal abl-CC, BCR-GG, Ex 8/9 AA, rs37621 (TT) und D6S314 (TT) nachgewiesen worden. In der Gruppe „andere TF“ verteilten sich die Ereignisse auf die Fragmente abl-CC (4/9), BCR-GG (4/9) und D6S308 TC (1/9). Auffällig war dabei, dass alle nachgewiesenen abl-CC Fragmente (4/4) in Gemischten Fraktionen vorkamen, bei denen der 26R1-Adapter 26RC gewesen war.

Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass ein Protokoll zur positiven und reinen Fraktionierung der Gemischten Fraktionen etabliert wurde. Dabei spielte es keine Rolle für die TG/GT-Fraktion, über welche Differenzierungsbase positiv selektiert wurde. Bei den Fraktionen AT/TA, AC/CA und AG/GA kam es zu einer höheren Ausbeute an Positivfragmenten, wenn nicht nach der Differenzierungsbase A selektiert wurde, weshalb dieses Vorgehen als Standard in das Protokoll aufgenommen wurde. Für die Fraktionen TC/CT und GC/CG wurde nur die Positivselektion nach der Differenzierungsbase C getestet.

### 3.2.5 Überblick über die Reinheit der Fraktionen

Eine Zusammenfassung über die Reinheit aller Einfachen und Gemischten Fraktionen gibt Tab. 31.

**Tab. 31** Falsch positive Ereignisse in Einfachen und Gemischten Fraktionen

Auswertung nach Fraktion									
AA	TT	CC	GG	AT/TA	CA	AG/GA	TC	TG/GT	GC
2/57	2/57	3/57	4/55	1/57	7/16	1/20	1/16	3/95	1/16
3,5%	3,5%	5,2%	7,2%	1,7%	43,7%	5,0%	6,2%	3,1%	6,2%



### 3.3 Verlust von Fragmenten während der Fraktionierung

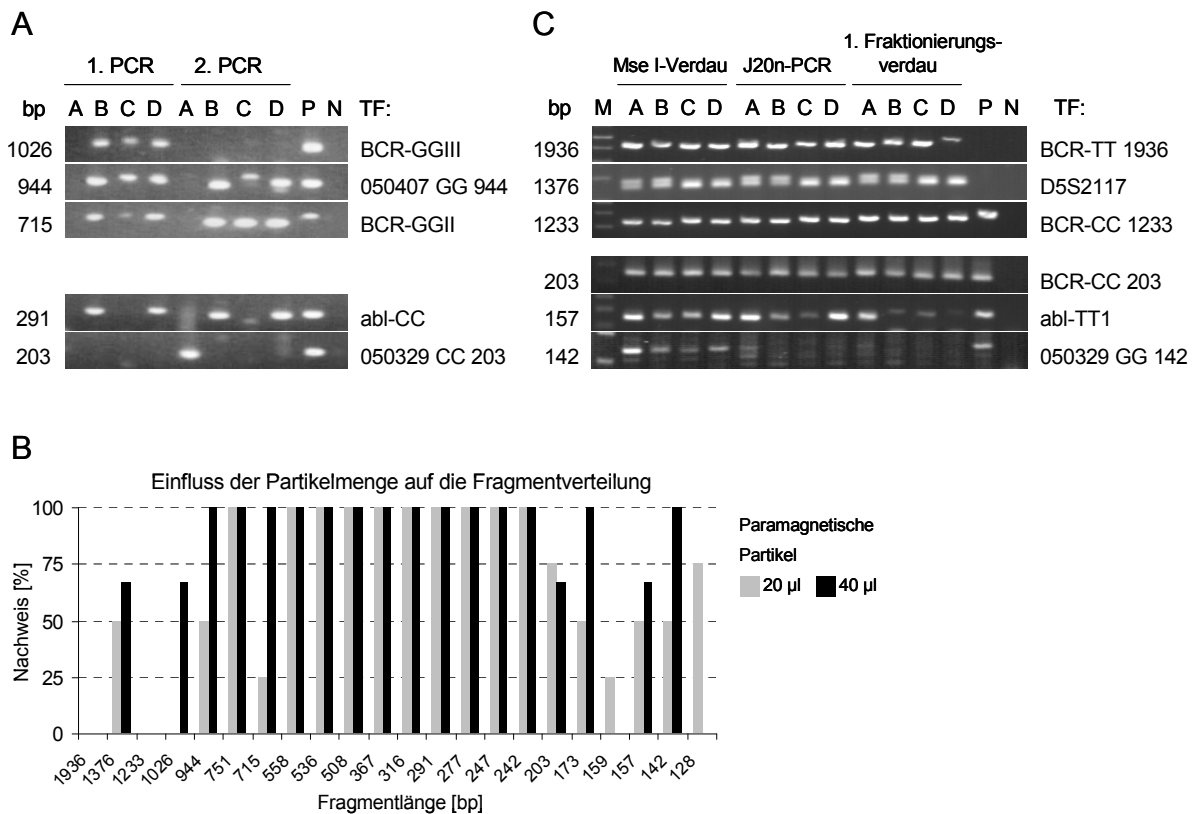
Bei der Evaluierung der Fragmentverteilung in Fraktionen durch das beschriebene Ausleseverfahren fiel auf, dass es zu Verlusten von erwünschten Fragmenten (Positivfragmente) kam. Um die Ursachen dafür aufzudecken, wurden einige Fraktionen systematisch auf das Vorhandensein von erwünschten Mse I-Fragmenten zwischen 147 und 1936 Basenpaaren Länge untersucht. Anschließend wurde versucht, dem Verlust durch gezielte Maßnahmen entgegenzuwirken.

Zunächst wurden vier GG- und vier CC-Fraktionen (je A – D, Abb. 26) analysiert, die nach dem beschriebenen Protokoll für fraktionsspezifische Adapter hergestellt wurden, wobei je 20 µl paramagnetische Streptavidin-Partikel (statt der später eingeführten 40 µl) für eine Positivselektion verwendet wurden. Die Fraktionen, die aus Probe A hergestellt wurden, waren bis auf eines der getesteten Fragmente falsch negativ. In den übrigen GG-Fraktionen konnten von drei Positivfragmenten der Längen 715, 944 und 1026 bp die beiden kürzeren sowohl nach der 1. als auch nach der 2. Fraktionierungs-PCR nachgewiesen werden. Das Fragment der Länge 1026 bp war hier nach der ersten, jedoch nicht mehr nach der 2. PCR vorhanden. Zwei CC-Fragmente der Länge 291 und 203 bp waren in den CC-Fraktionen zum Teil schon in der 1. PCR nicht nachweisbar. Fragmente, die jedoch nachgewiesen wurden, blieben in der 2. PCR ebenfalls erhalten (Abb. 26). Offenbar gab es sowohl bei Fragmenten über ca. 1000 bp und unter ca. 300 bp Verluste, die evt. auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden mussten.

Zunächst wurde die Elongationszeit der Zyklen in der 1. PCR von 40 sec auf mindestens 1 min 20 sec (+ 1 sec/Zyklus) verlängert, um zu verhindern, dass lange Fragmente nicht elongiert und in der Folge durch die *Mung Bean* Nuklease abgebaut wurden. Unter Umständen waren die langen Fragmente schon bei der Ligation an die biotinylierten Adapter benachteiligt, was auf eine sterische Behinderung oder die Bildung komplexer Sekundärstrukturen zurückzuführen sein könnte. Daher wurde zudem die Anzahl der freien bio-26RN-Adapter durch den Einsatz von mehr paramagnetischen Partikeln (Vergleich zwischen 20 und 40 µl) bei der Herstellung von je drei AA-, TT-, CC- und GG-Fraktionen erhöht. Abb. 26B zeigt, dass durch beide Maßnahmen die Bandbreite der Fragmentverteilung, in der in 100% der Fraktionen ein betreffendes Fragment nachgewiesen wurde, von 242 – 558 bp auf 242 – 944 bp ausgedehnt werden konnte. Allerdings kam es weiterhin zu Verlusten von Fragmenten der beiden Größenordnungen >1000 bp und <250 bp (Abb. 26B). Dieser Effekt war nicht durch eine weitere Erhöhung der Partikelmenge auf 80 µl zu steigern (Daten nicht gezeigt).

Da die Rückgewinnungsrate von Fragmenten nach der Aufreinigung eines PCR-Produkts über eine DNA-Säule größenabhängig ist, sollte definiert werden, bei welchem Protokollschritt Fragmente verloren gingen und ob dies mit der Verwendung von DNA-Säulen korreliert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden drei aufeinander aufbauende Produkte des Fraktionierungsprotokolls der Proben A – D analysiert: (1) Das Produkt der initialen Reamplifizierung, das nach einer Aufreinigung durch eine Microcon-Y30-Säule (Amicon) mit Mse I inkubiert und neuerdings durch eine Microcon-

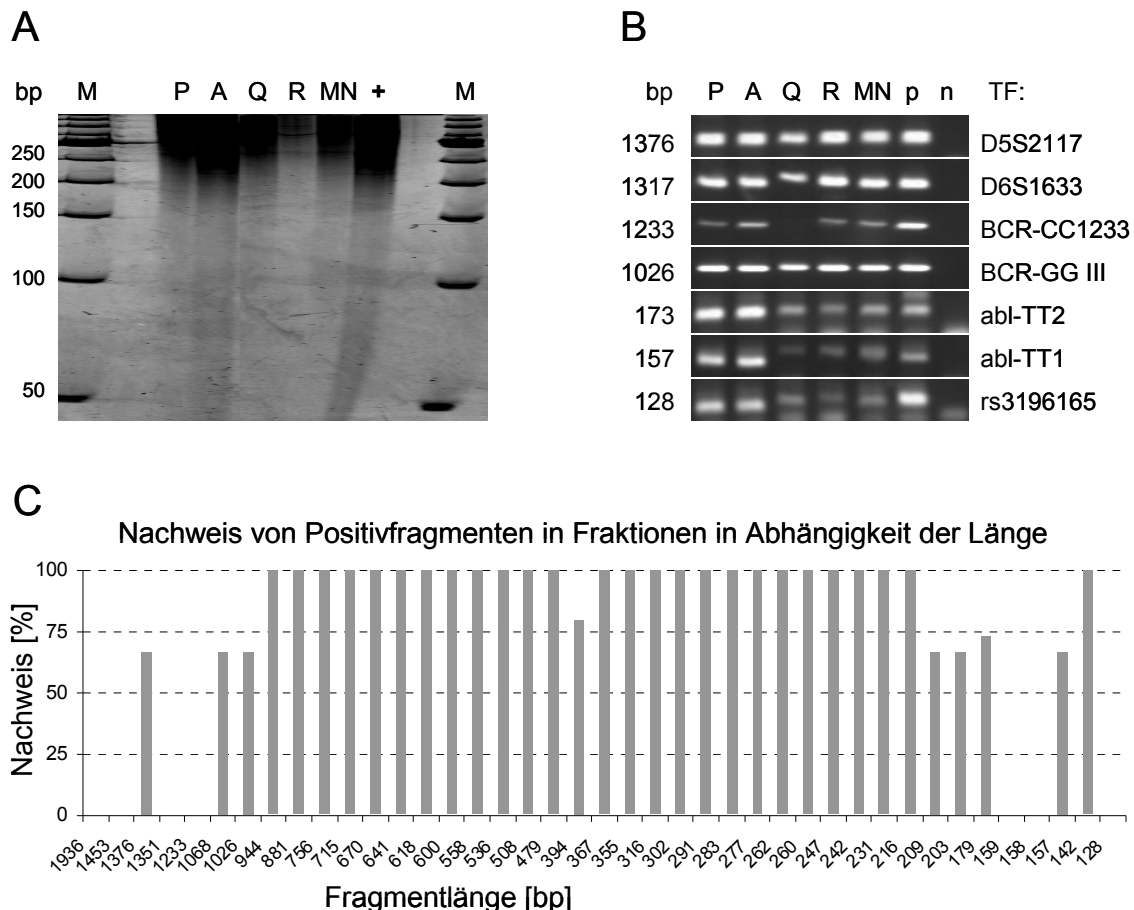
Y30-Säule aufgereinigt wurde (Schritt 2, vergleiche Abb. 8), (2) das Produkt der J20n-PCR nach der Verwendung einer *Wizard® SV* PCR-Säule (Promega, Schritt 3), (3) das Eluat einer QIAquick-Säule (Qiagen) nach dem 1. Fraktionierungsverdau (Schritt 4).



**Abb. 26** Fragmentverlust im Verlauf des Fraktionierungsprotokolls. **(A)** Nachweis von Positivfragmenten in GG-Fractionen (oben) und CC-Fractionen (unten), die jeweils aus den Proben A – D hergestellt wurden, nach der 1. und 2. PCR **(B)** Einfluss der bei der Positivselektion verwendeten Partikelmenge auf den Nachweis von Positivfragmenten in Abhängigkeit von der Fragmentlänge **(C)** Nachweis von Positivfragmenten >1200 bp (oben) und <210 bp (unten) in den Proben A – D im Verlauf der Vorbereitung (Schritt 2 – 4) zur Fraktionierung (bp: Basenpaare, M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, TF: Testfragment)

Es wurde deutlich, dass die Fragmente  $\geq 1233$  bp bis zu dem Beginn der Fraktionierung nach Schritt 4 in den Proben erhalten blieben, die Fragmente  $\leq 157$  bp jedoch im Verlauf des Protokolls abgereichert wurden. Nach Protokollschritt 3 (J20n-PCR), bei dem eine *Wizard® SV* PCR-Säule (Promega) verwendet wurde, war ein 142 p großes Testfragment abgereichert, nach dem nächsten Schritt, bei dem eine QIAquick-Säule (Qiagen) verwendet wurde, waren auch die Fragmente der Länge 157 bp verschwunden. Je zwei Ansätze einer J20n PCR wurden daraufhin mittels DNA-Säulen verschiedener Hersteller aufgereinigt, die Eluate auf je 100 µl mit PCR-H<sub>2</sub>O aufgefüllt und davon je 5 µl in einem 7 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Auflösung des Gels ist zwischen 50 und 250 bp besonders hoch, weshalb die Verteilung der DNA-Fragmente in diesem Bereich gut zu beurteilen war (Abb. 27A). Die Mehrheit der Säulen, so wie die verwendete QIAquick-Säule, zeigte im Vergleich zu

einer nicht gereinigten Probe J20n-PCR (Positivkontrolle, +) eine deutliche Abreicherung von Fragmenten unter ca. 200 bp. Am stärksten ähnelte die Fragmentverteilung nach einer Microcon-Y30-Säule von Amicon (A) der Positivkontrolle, hier waren Fragmente bis unter 50 bp auf dem Gel sichtbar. Eine Wizard® SV PCR-Säule von Promega (P) erzielte eine gute Rückgewinnung bis ca. 100 bp.



**Abb. 27** Verlust von Fragmenten durch die Verwendung von DNA-Säulen **(A)** Fragmentverteilung in J20n-PCR-Produkten vor (+) und nach der Verwendung von Säulen der Hersteller Promega (P, Wizard® SV PCR), Amicon (A, Microcon-Y30), Roche (R, High Pure PCR Product Purification Kit), Qiagen (Q, QIAquick), Macherey-Nagel (MN, Nucleospin Extract 2) **(B)** Nachweis von Testfragmenten (TF) in den Produkten aus (A) (p: Positiv-, n: Negativkontrolle) **(C)** Überblick über die Fragmentverteilung in 15 Einfachen und 37 Gemischten Fraktionen

Das Ergebnis der Auswertung mittels PAA-Gel wurde durch ein Ausleseverfahren von Fragmenten  $\geq 1026$  bp und  $\leq 173$  bp evaluiert. Auch hier zeigte sich, dass die Rückgewinnung kleiner Fragmente unter 173 bp durch die Säulen von Qiagen, Roche und Macherey-Nagel beeinträchtigt war, jedoch in Eluatn der Amicon- und Promega-Säulen nach wie vor vorhanden waren (Abb. 27B). Nach Herstellerangaben liegt bei den meisten DNA-Aufreinigungssäulen die Rückgewinnungsrate bei 80-90% für Fragmente unter 100 bp. Sie beziehen sich auf die Aufreinigung von spezifischen PCR-

Produkten, die stark angereichert vorliegen. Diese lassen sich tatsächlich nach einer Aufreinigung zu großen Anteilen zurückgewinnen. Für die hier benötigte Aufreinigung von Fragmentgemischen, die eine absolut betrachtet geringe Konzentration jedes einzelnen Fragmentes beinhalten, waren die meisten Säulen jedoch ungeeignet.

Im Folgenden wurde daher auf andere Aufreinigungssysteme als Microcon-Y30 (Amicon) und Wizard® *SV PCR Clean-up System* (Promega) verzichtet. Abb. 27C zeigt die Verteilung aller positiv nachgewiesenen erwünschten Fragmente in 15 Einfachen und 37 Gemischten Fraktionen<sup>28</sup> in Abhängigkeit von ihrer Länge. Es ist zu erkennen, dass durch die beschriebenen Maßnahmen der Verlust bei den kleinen Fragmenten von 242 bp auf 216 bp gesenkt werden konnte, es jedoch weiterhin zu Verlusten von Fragmenten über 944 bp und unter 216 bp kam.

### 3.4 Einführung in die Subtraktion

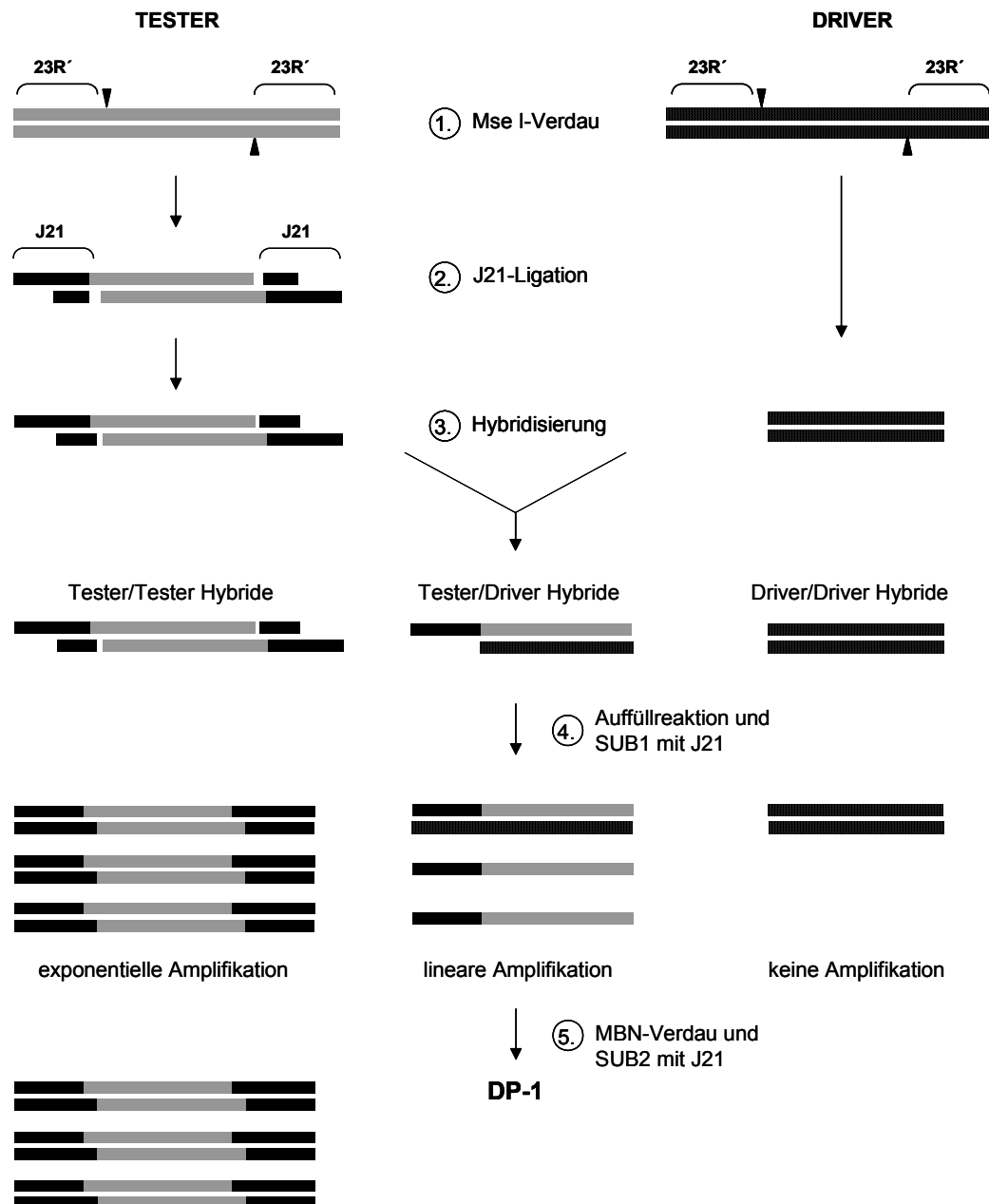
Die Subtraktion von zwei Sequenzpopulationen – Tester und Driver - dient dazu, differentiell vorkommende Sequenzen aus dem Tester zu isolieren. Sie werden mit Hilfe eines Tester-spezifischen Adapters in aufeinander aufbauenden Polymerase Kettenreaktionen exponentiell angereichert, während die Sequenzen des Testers abgebaut werden, die ebenfalls im Driver vorkommen.

Lisitsyn, Lisitsyn et al. entwickelten 1993 erstmals ein Protokoll (*Representational Difference Analysis*, RDA), das die subtraktive Hybridisierung von komplexen Genomen höherer Organismen ermöglichte, indem sie die Hybridisierungskinetik für Tester-Homoduplexe verbesserten (siehe auch Einleitung). Eine wesentliche Neuerung bestand in der Herstellung von Repräsentationen der beiden zu subtrahierenden Sequenzpools, die als Tester und Driver eingesetzt wurden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Herstellung von Tester und Driver die Methode der Fraktionierung entwickelt. Das experimentelle Vorgehen für die Subtraktion von Fraktionen wurde – mit Modifikationen – aus dem Protokoll von Lisitsyn, Lisitsyn et al. übernommen.

Erreicht wird die selektive Anreicherung von differentiellen Fragmenten durch mehrere Depletionsrunden. In der ersten Depletionsrunde wird zunächst der Oligonukleotid-Adapter J21 an den Tester ligiert (Abb. 28, Schritt 1 und 2) und dieser anschließend in der so genannten subtraktiven Hybridisierung mit einem Überschuss an Driver gemischt, denaturiert und anschließend wieder hybridisiert (Schritt 3).

---

<sup>28</sup> Nach Protokoll s. Anhang



**Abb. 28** Schematische Darstellung der Tester- und Driverfragmente während der ersten Depletionsrunde (1.) Abtrennen der Fraktionierungs-Primer 23R' von Tester und Driver durch Mse I-Verdau (2.) Ligation des Adapters J21 (1. und 3. Runde) bzw. R21 (2. und 4. Runde) an den Tester (3.) Denaturierung und Hybridisierung von Tester und Driver (4.) Auffüllreaktion von J21 und anschließend testerspezifische PCR (SUB1) (5.) Abbau von Einzelstrangfragmenten durch einen MBN-Verdau und zweite testerspezifische PCR (SUB2) mit J21, das Produkt ist DP-1.

Bei der Renaturierung kommt es sowohl zu der Bildung von Heteroduplexen aus Fragmenten des Drivers und des Testers (Tester/Driver Hybride), als auch zu der Bildung von Homoduplexen (Driver/Driver Moleküle und Tester/Tester Moleküle). Während Normalsequenzen des Testers durch den großen Überschuss des Drivers hauptsächlich Heteroduplexe bilden, können differentielle Fragmente des Testers nur untereinander hybridisieren, also nur Homoduplexe bilden. In einer nachfolgenden PCR werden diese Homoduplexe über ihre Adaptersequenzen exponentiell, alle

anderen Fragmente des Testers jedoch nur linear amplifiziert (Schritt 4). Diese werden in der Folge zum großen Teil durch einen enzymatischen Verdau abgebaut, worauf eine weitere testerspezifische PCR folgt („SUB2“, Schritt 5). Das Produkt dieser ersten Depletionsrunde (DP-1) wird in weitere Runden als Tester eingesetzt, um die Anreicherung zu verstärken und den Hintergrund an nicht abgebauten Normalsequenzen weiter zu verringern. Hierbei wird die Menge des Testers sukzessive reduziert und die Adapter J21 und R21 jeweils im Wechsel verwendet.

### 3.4.1 Testsysteme für die Subtraktion

Die Subtraktion wurde zunächst mit Testern und Drivern durchgeführt, die sich nur durch ein differentielles DNA-Fragment bekannter Sequenz unterschieden (Testsysteme). Sie stellten Positivkontrollen für das Subtraktionsprotokoll dar und ermöglichten es, die Anreicherung von differentiellen Fragmenten fortlaufend zu kontrollieren.

Die Testsysteme bestanden aus einem Driverpool von Normalfragmenten und Testerpools, in die zusätzlich ein differentielles Fragment gemischt wurde. Verschiedene Testerpools enthielten das jeweilige differentielle Fragment mit unterschiedlichen Differenzierungsbasen. Auf diese Weise konnten beispielsweise für das BCR-ABL Testsystem die Fraktionen AA, TT, CC und GG hergestellt werden, die alles das BCR-ABL Fragment mit den entsprechenden Differenzierungsbasen enthielten. Die Subtraktion erfolgte mit positiven und reinen Fraktionen.

Um zu ermitteln, wie häufig ein differentielles Fragment in einer Zelle vorliegen muss, um durch die Subtraktion von Tester- und Driver-Fraktionen identifiziert zu werden (Bestimmung der Nachweisgrenze), wurden Testerpools mit unterschiedlichen Konzentrationen der differentiellen Fragmente hergestellt. Ihre absolute Konzentration in den Testerpools wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und mit der Konzentration eines Mse I-Fragmentes aus dem *single copy* Gen *AGTR* verglichen. Die Nachweisgrenze von differentiellen Fragmenten mit der Subtraktion von Fraktionen wird daher im Folgenden als Vielfaches dieses Fragments angegeben.

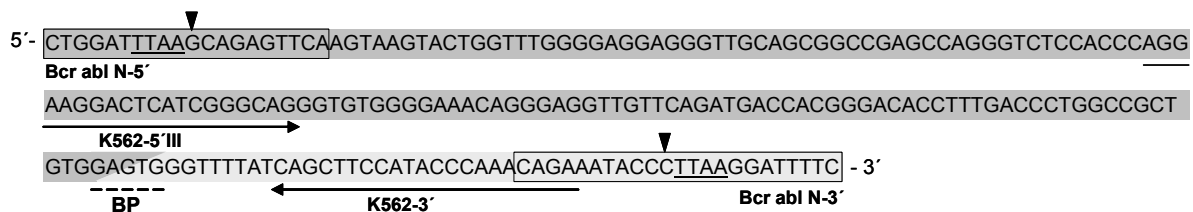
**Tab. 32** Absolute Quantifizierung eines Mse I-Fragments aus *AGTR*

	Standard	Crossing-Point		Konzentration [ng/ml]		Mittelwert [ng/ml]
	[ng/ml]	Probe	Replikat	Probe	Replikat	
Leerwert		-		-		
Standard 1	6,656	14,21	14,50	7,091	5,903	6,497
Standard 2	$6,656 \times 10^{-1}$	18,13	17,64	$6,091 \times 10^{-1}$	$8,260 \times 10^{-1}$	$7,176 \times 10^{-1}$
Standard 3	$6,656 \times 10^{-2}$	21,74	21,71	$6,367 \times 10^{-2}$	$6,470 \times 10^{-2}$	$6,419 \times 10^{-2}$
Standard 4	$6,656 \times 10^{-3}$	25,45	25,25	$6,243 \times 10^{-3}$	$7,077 \times 10^{-3}$	$6,660 \times 10^{-3}$
Standard 5	$6,656 \times 10^{-4}$	29,01	29,02	$6,696 \times 10^{-4}$	$6,680 \times 10^{-4}$	$6,688 \times 10^{-4}$
LP 1:2,5		23,99	23,94	$1,557 \times 10^{-2}$	$1,601 \times 10^{-2}$	$1,579 \times 10^{-2}$
LP 1:25		28,06	27,98	$1,219 \times 10^{-3}$	$1,283 \times 10^{-3}$	$1,251 \times 10^{-3}$
LP 1:250		31,12	31,05	$1,794 \times 10^{-4}$	$1,877 \times 10^{-4}$	$1,835 \times 10^{-4}$

Um zunächst die Konzentration des Mse I-Fragments aus dem *single copy* Gen *AGTR* in dem Driverpool LP der Testsysteme zu messen, wurde eine Standardkurve für eine absolute Quantifizierung dieses Fragments erstellt. Hierfür wurde es mit Hilfe von spezifischen PCR-Primern aus Mse I-Repräsentationen von Lymphozyten selektiv amplifiziert (2.4.4), das PCR-Produkt mittels Gelextraktion aufgereinigt und die Konzentration im Eluat mittels DNA-abhängiger Fluoreszenz gemessen. Aus dem Eluat wurden die Proben für die Standardkurve verdünnt. Die Quantifizierung der Probe LP (Verdünnungen 1:2,5, 1:25 und 1:250) wurde mit dem Primerpaar „AGTR-279“ in Duplikaten durchgeführt. Unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren ergab der Mittelwert der sechs Messwerte (Tab. 32, grau unterlegt) eine Konzentration des *AGTR*-Fragments von  $3,89 \times 10^{-2}$  ng/ml (38,9 fg/μl) im Driverpool LP.

#### 3.4.1.1 BCR-ABL Testsystem

Für das BCR-ABL Testsystem wurde ein humanes Mse I-Fragment als differentielles Fragment verwendet, das eine Bruchpunktfusion der Translokation t(22;9) enthielt, welche unter anderem bei der Chronischen Myeloischen Leukämie (CML) zur Entstehung des BCR-ABL Fusionsgens führt.

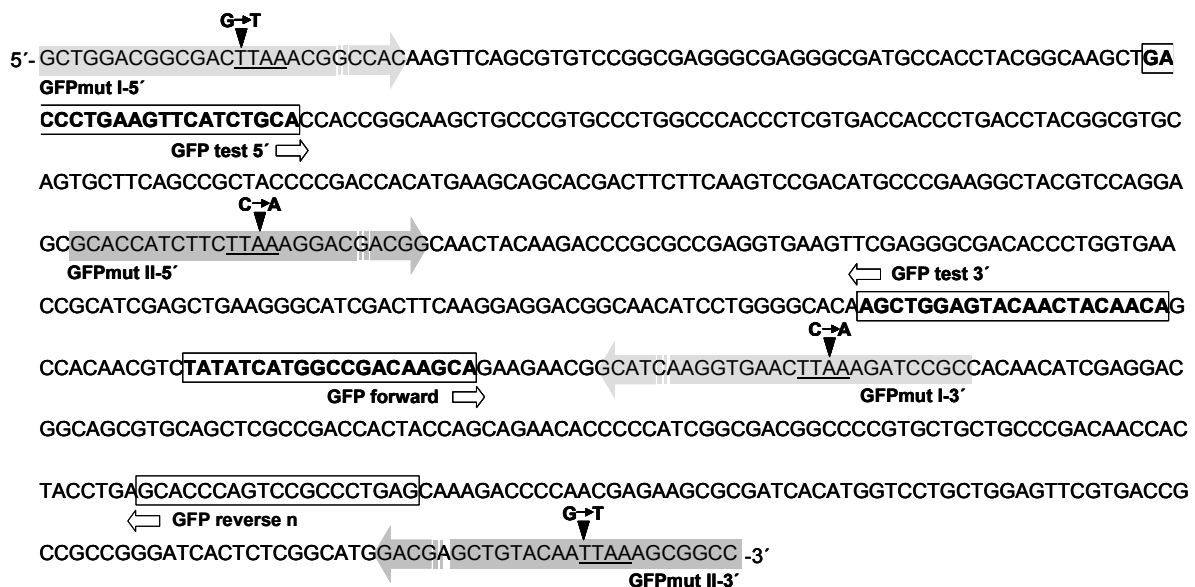


**Abb. 29** Differentielle Fragmente des BCR-ABL Testsystems: Mse I-Fragmente mit dem BCR-ABL Bruchpunkt der Translokation t(22;9) wurden aus Mse I-Repräsentationen von K562-Zellen mit Hilfe der Primer „Bcr abl N“ (umrandet) angereichert und durch den Austausch zweier Basen in ihren Differenzierungsbasen verändert (Pfeilspitzen: G→A, G→T oder G→C bzw. C→A, C→T, oder C→G). Bcr abl N-5' Primer erkannten eine Sequenz von Chromosom 22 (dunkelgrau markiert), Bcr abl N-3' Primer erkannten eine Sequenz von Chromosom 9 (hellgrau markiert). Der Bruchpunkt (BP) befand sich innerhalb von fünf Basen (gestrichelte Linie), die beiden Sequenzen gemein sind. Der spezifische Nachweis der Fragmente erfolgte mit dem Primerpaar „K562“ (durch Pfeile gekennzeichnet).

Dieses Mse I-Fragment von 211 bp wurde aus DNA der Zelllinie K562 mit Hilfe von PCR-Primern („Bcr abl N“), die die Mse I-Schnittstellen überspannten und an der Position der Differenzierungsbasen einen Basenaustausch aufwiesen, angereichert. Durch den Basenaustausch konnten zehn BCR-ABL Fragmente generiert werden, die die Differenzierungsbasen der zehn Fraktionen trugen. Diesen Fragmenten wurde der Lib1-Adapter angefügt, woraufhin sie 238 Basenpaare umfassten; je eines davon wurde einer Population von Normalfragmenten beigemischt (Testerpools). Der spezifische Nachweis der BCR-ABL Fragmente erfolgte mit Hilfe des Primerpaares „K562“ (Abb. 29).

### 3.4.1.2 GFPmut Testsystem

Ein weiteres Testsystem verwendete differentielle Fragmente aus dem GFP-Gen (*Green Fluorescent Protein*) der Qualle *Aequorea victoria*. Da das Gen nicht über Mse I-Schnittstellen verfügt, wurden diese bei der Anreicherung der Fragmente durch die Primerpaare „GFPmut I“ (Abb. 30, hellgrau markiert) bzw. „GFPmut II“ (dunkelgrau markiert) eingefügt. In einem weiteren Schritt wurden – wiederum durch den Austausch von Basen in PCR-Primern – die Differenzierungsbasen der Fragmente variiert. Die Fragmente wurden mit Lib1-Adaptoren versehen (Länge GFPmut I: 471 bp; GFPmut II: 458 bp) und Testerpools von DNA-Fragmenten beigemischt. Sie konnten mit den Primerpaaren „GFP test“ bzw. „GFP forward/reverse“ spezifisch nachgewiesen werden (Abb. 30 umrahmt).



**Abb. 30** Differentielle Fragmente des GFPmut Testsystems: Die PCR-Produkte der Primer „GFPmut I“ (hellgrau markiert) und „GFPmut II“ (dunkelgrau markiert) wurden durch den Austausch zweier Basen mit Mse I-Schnittstellen versehen (G→T bzw. C→A). Diese GFPmut Fragmente wurden in ihren Differenzierungsbasen verändert, mit Lib1-Adaptoren ligiert und in Testerpools gemischt. Der spezifische Nachweis der Fragmente erfolgte mit den Primerpaaren „GFP test“ bzw. „GFP forward/reverse“ (umrandet).



### 3.4.2 Erfolgreiche Subtraktionen: Isolierung differentieller Tester-Fragmente

#### 3.4.2.1 Testsystem GFPmut I

Um die Nachweisgrenze der Subtraktion zu bestimmen, wurden TT-, CC-, und GG-Fraktionen aus einem Driverpool und verschiedenen Testerpoolen hergestellt und subtrahiert. Hierfür wurden zunächst drei Testerpoolen mit den differentiellen Fragmenten GFPmut I-TT (Testerpool TT<sub>0</sub>), GFPmut I-CC (CC<sub>0</sub>) und GFPmut I-GG (GG<sub>0</sub>) versetzt, wobei deren Konzentration in etwa auf das Niveau des BCR-ABL Bruchpunktfragmentes in Mse I-Repräsentationen von K562-Zellen eingestellt wurde (2.9.4). Anschließend wurde eine absolute Quantifizierung der GFPmut I-Fragmente mittels quantitativer PCR vorgenommen, für die eine Standardkurve aus einem isoliert vorliegenden GFPmut I-Fragment bekannter Konzentration gemessen wurde. Die Testerpoolen TT<sub>0</sub>, CC<sub>0</sub> und GG<sub>0</sub> wurden vor der Messung im Verhältnis 1:100 verdünnt und die quantitative PCR mit dem Primerpaar „GFP test“ durchgeführt (Tab. 33).

**Tab. 33** Absolute Quantifizierung des GFPmut I-Fragments in Testerpoolen

	Standard [ng/ml]	Crossing-Point		Konzentration [ng/ml]		Mittelwert [ng/ml]
		Probe	Replikat	Probe	Replikat	
Leerwert		>36,00	-	$1,958 \times 10^{-5}$	-	
Standard 1	11,7	15,11	14,80	12,37	15,00	13,68
Standard 2	1,17	18,86	19,05	1,119	0,994	1,057
Standard 3	$1,17 \times 10^{-1}$	22,64	22,63	$1,004 \times 10^{-1}$	$1,008 \times 10^{-1}$	$1,006 \times 10^{-1}$
Standard 4	$1,17 \times 10^{-2}$	25,90	26,08	$1,250 \times 10^{-2}$	$1,109 \times 10^{-2}$	$1,179 \times 10^{-2}$
Standard 5	$1,17 \times 10^{-3}$	29,34	29,56	$1,386 \times 10^{-3}$	$1,199 \times 10^{-3}$	$1,293 \times 10^{-3}$
TT <sub>0</sub> 1:100		22,84	22,91	$8,790 \times 10^{-2}$	$8,408 \times 10^{-2}$	$8,599 \times 10^{-2}$
CC <sub>0</sub> 1:100		22,04	22,18	$1,470 \times 10^{-1}$	$1,342 \times 10^{-1}$	$1,406 \times 10^{-1}$
GG <sub>0</sub> 1:100		22,92	22,86	$8,383 \times 10^{-2}$	$8,701 \times 10^{-2}$	$8,542 \times 10^{-2}$

Die GFPmut I-Konzentrationen in den Testerpoolen wurden unter Einbeziehung der Verdünnungsfaktoren aus den Mittelwerten der Duplikate (grau unterlegt) berechnet und zu der Konzentration des AGTR-Fragments ins Verhältnis gesetzt. Da die Intensität des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffes in der qPCR von der Länge des PCR-Produktes abhängt, wurden die berechneten Verhältnisse durch den Faktor 2,99 geteilt. Dieser ergibt sich aus dem Längenverhältnis der PCR-Produkte von „GFP test“ zu „AGTR-279“ (314 bp : 105 bp = 2,99).

$$[TT_0] : [AGTR] = (8,599 \text{ ng/ml} : 0,0389 \text{ ng/ml}) : 2,99 = 73,9$$

$$[CC_0] : [AGTR] = (14,06 \text{ ng/ml} : 0,0389 \text{ ng/ml}) : 2,99 = 120,9$$

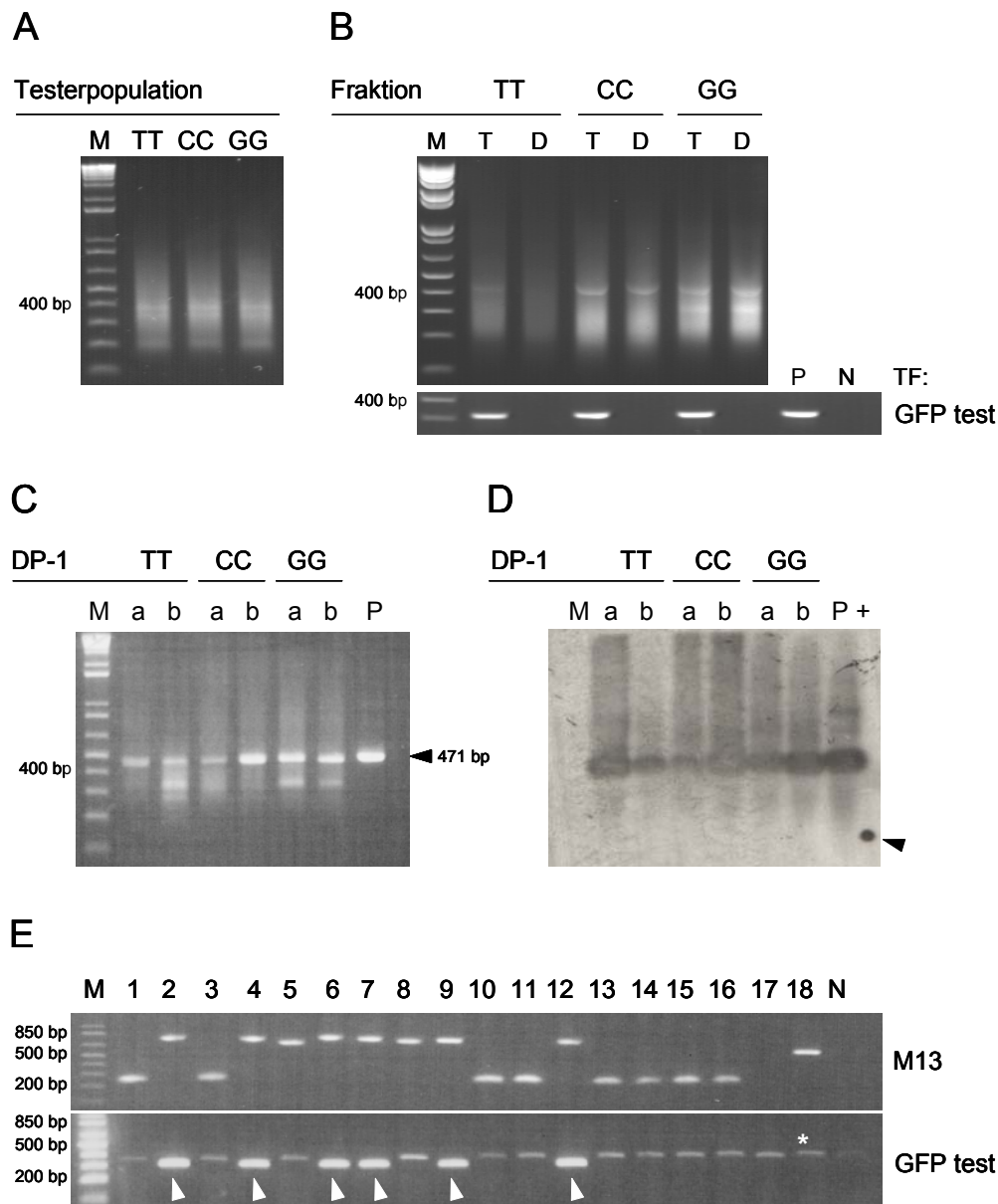
$$[GG_0] : [AGTR] = (8,542 \text{ ng/ml} : 0,0389 \text{ ng/ml}) : 2,99 = 73,4$$

Hieraus folgt, dass die differentiellen Fragmente in den Testerpoolen zwischen ca. 73 und 120mal häufiger vorlagen, als das Mse I-Fragment aus dem *single copy* Gen AGTR.

In diesem Experiment sollte ebenfalls geprüft werden, ob zur Subtraktion von fraktionierten Proben ein Protokoll nach Lisitsyn oder ein Protokoll nach Felske besser geeignet wäre bzw. eines eine niedrigere Nachweisgrenze für differentielle Fragmente hätte. In seinen Experimenten zur Subtraktion von zwei *Bacillus*-Stämmen konnte Felske zeigen, dass durch eine Modifikation des RDA-Protokolls nach Lisitsyn schon nach einer Depletionsrunde differentielle Fragmente angereichert werden konnten (Felske 2002). Dieses Protokoll unterscheidet sich von dem Originalprotokoll in der Weise, dass Adaptersequenzen aus der Herstellung des Drivers vor der subtraktiven Hybridisierung nicht abgetrennt werden (hier also durch Auslassen des Mse I-Verdaus des Drivers). Dies soll nach der Hybridisierung in Tester/Driver-Hybriden zu einer sterischen Inhibition zwischen der J21- und der nicht-komplementären Adaptersequenz des Driverfragments führen, eine Auffüllreaktion des J21-Adapters erschweren und so die lineare Amplifikation dieser Fragmente behindern.

Aus den Testerpools TT<sub>0</sub>, CC<sub>0</sub> und GG<sub>0</sub> und dem Driverpool LP des Testsystems GFPmut I wurden die Fraktionen TT, CC bzw. GG hergestellt, diese auf Positivität und Reinheit getestet und reamplifiziert. Abb. 31A zeigt die Fragmentverteilungen in den Testerpools vor der Fraktionierung und in den fertigen Tester (T) - und Driverfraktionen (D). In den Fraktionen (außer in der TT-Driverfraktion) war eine Bande auf einer Höhe von etwas über 400 bp zu erkennen, die während der Fraktionierung entstanden war (Abb. 31B). In den GG-Fraktionen war zusätzlich dazu noch ein in etwa 300 – 320 bp langes Fragment in Form eine Bande angereichert worden.

Pro Fraktion wurden zwei Subtraktionsansätze vorbereitet, wofür je 400 ng Tester mit dem Adapter J21 ligiert wurde. Für ein Subtraktionsprotokoll nach Felske (Abb. 31C a) wurde der Tester mit 40 µg Driver aus einer Reamplifizierung gemischt, für ein Subtraktionsprotokoll nach Lisitsyn (b) wurden 40 µg Driver aus einer Reamplifizierung zunächst mit Mse I inkubiert, um die Sequenzen der Fraktionsierungsadapter abzutrennen, über eine DNA-Säule gereinigt und anschließend mit dem Tester gemischt. Dann wurde mit allen Proben eine Depletionsrunde durchgeführt. Je 3 µl der Produkte der ersten Depletionsrunde DP-1 TT, DP-1 CC und DP-1 GG wurden auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen. In allen Proben waren Fragmente von ca. 450 – 480 bp Länge in Form von Banden angereichert worden. Zusätzlich waren in den Proben DP-1 TT b sowie DP-1 GG a und b Banden von ca. 320 bp zu erkennen. Die Frage nach der Herkunft dieser Banden, die höchst wahrscheinlich als falsch positive Ereignisse gewertet werden müssen, wird unter 3.4.3 näher behandelt. Um die Identität der angereicherten Fragmente von ca. 450 – 480 bp Länge zu klären, wurde die DNA in einem Southern-Blot auf eine Nylonmembran übertragen, mit einer Digoxigenin-markierten spezifischen DNA-Sonde für die GFPmut I-Sequenz hybridisiert und diese durch eine Chemolumineszenz-Reaktion nachgewiesen (Abb. 31D). Zusätzlich wurden die Fragmente aus einem weiteren Agarosegel extrahiert, in Plasmid-Vektoren ligiert, diese anschließend in kompetente Bakterien transformiert und mittels Screening-PCR analysiert.



**Abb. 31** Subtraktion des GFPmut I-Testsystems (**A**) Fragmentverteilung in den Mse I-Repräsentationen der Testerpools TT<sub>0</sub>, CC<sub>0</sub> und GG<sub>0</sub> nach einer Reamplifikation (**B**) Fragmentverteilung der Fraktionen TT, CC und GG nach einer Reamplifikation (T: Tester, D: Driver) und Nachweis des GFPmut I-Fragments (Testfragment GFP test) (**C**) Produkte der ersten Depletionsrunde DP-1 TT, DP-1 CC, DP1 GG; Positivkontrolle P zeigt isoliertes GFPmut I Fragment (a: Protokoll nach Felske, b: nach Lisitsyn) (**D**) Chemolumineszenz-Reaktion auf einem Southern-Blot der Proben aus (C) nach Hybridisierung mit einer GFPmut I spezifischen Sonde (+: Positivkontrolle für die Hybridisierung auf der Nylonmembran, Pfeilspitze) (**E**) „Screening PCR“ von *E. coli* Klonen 1 - 18 mit den Primerpaaren M13 bzw. GFP test nach Transformation mit Plasmid-Vektoren, die DNA-Fragmente aus den Proben DP-1 TT (1 – 9) und DP-1 GG (10 – 18) inseriert hatten (M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, bp: Basenpaare, \*: unspezifische Amplifikation in den Klonen 1, 3, 5, 8, 10, 11, 13-18)

Die fraglichen Banden zeigten ein starkes Signal für die Chemolumineszenz-Reaktion nach Hybridisierung der GFPmut I-spezifischen Sonde (Abb. 31E). In sechs von acht Klonen, in die erfolgreich ein Plasmid mit inseriertem DNA-Fragment eingebracht worden war (Primerpaar M13),

wurde das GFPmut I-Fragment nachgewiesen (Primerpaar GFP test). Es wurde aus diesen Experimenten geschlossen, dass sowohl das Subtraktionsprotokoll nach Lisitsyn als auch das nach Felske geeignet war, um differentielle Fragmente in Testerfraktionen zu identifizieren, die zwischen ca. 73 und 120mal häufiger vorlagen, als ein Mse I-Fragment aus einer einmal vorkommenden Sequenz. Ein Vorteil des einen Protokolls gegenüber dem anderen wurde nicht festgestellt.

### 3.4.2.2 Testsystem GFPmut II

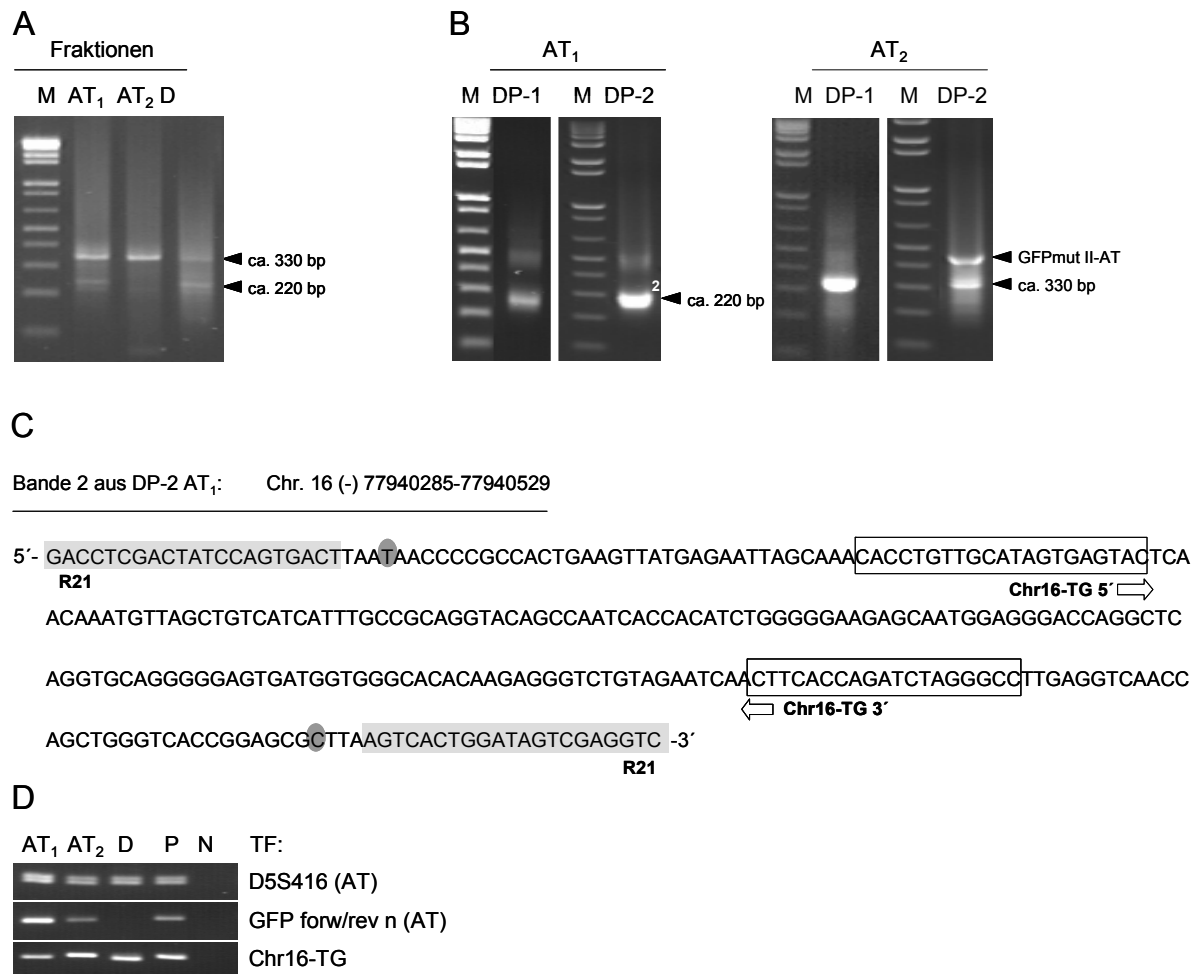
Es sollte festgestellt werden, ob auch durch die Subtraktion von Gemischten Fraktionen differentielle Fragmente isoliert werden konnten und in welcher relativen Häufigkeit diese in den Proben vorliegen mussten. Es wurden Testerpopulationen angefertigt, in denen die Konzentrationen des differentiellen Fragments GFPmut II-AT in etwa dem 126fachen ( $AT_1$ ) und dem 12,6fachen ( $AT_2$ ) des Fragments *AGTR* entsprachen<sup>29</sup>. Aus diesen Testerpools sowie dem Driverpool LP wurden AT-Fraktionen hergestellt und auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen (Abb. 32A). Neben einer ansonsten gleichmäßigen Fragmentverteilung zeigten die Fraktionen eine Bande auf einer Höhe von ca. 330 bp. In den Fraktionen  $AT_1$  und D gab es eine weitere Bande auf der Höhe von ca. 220 bp.

Es wurden zwei Depletionsrunden mit den Testern  $AT_1$  und  $AT_2$  durchgeführt<sup>30</sup> und die Produkte DP-1 und DP-2 in einem analytischen Agarosegel aufgetrennt. DP-1 des Testers  $AT_1$  zeigte eine unscharfe Bande auf der Höhe des GFPmut I-Fragments (458 bp) und eine etwas stärkere Bande, die sich auf der Höhe von ca. 220 bp befand (Bande 2, Abb. 32B). Im Gegensatz zu dieser Bande wurde die mutmaßliche Bande des GFPmut II-Fragmentes durch eine zweite Depletionsrunde nicht weiter angereichert. Eventuell wurde hier die Anreicherung des GFPmut II-Fragmentes durch das ca. 220 bp große Fragment verhindert. Anders stellte sich das Ergebnis der Subtraktion des Testers  $AT_2$  dar: Eine Bande von ca. 330 bp, die in DP-1 ein starkes Signal zeigte, war in DP-2 abgereichert worden. Hier trat eine zweite Bande von ca. 460 bp auf (Abb. 32B). Eine Sequenzierung ergab, dass es sich um das GFPmut II-Fragment handelte. Daher konnte die Detektionsgrenze für ein differentielles Fragment in diesem Experiment auf etwa das 12,6fache eines in einer Zelle in zwei Kopien vorliegenden Fragments festgelegt werden.

Um aufzuklären, warum das GFPmut II-Fragment nicht aus der  $AT_1$ -Fraktion isoliert werden konnte, obwohl es in ihr zehnmal häufiger vorlag als in der  $AT_2$ -Fraktion, wurde die stark angereicherte Bande von 220 bp aus DP-2 extrahiert und kloniert. Eine Sequenzierung des Fragmentes ergab, dass es sich um ein TG-Fragment von Chromosom 16 handelte. Eventuell war die Anreicherung von GFPmut II durch die starke Anreicherung dieses Fragmentes unterdrückt worden, das entweder eine falsch positive Bande der Subtraktion oder tatsächlich ein differentielles Fragment zwischen dem Tester  $AT_1$  und dem Driver D darstellte.

<sup>29</sup> Je 4 µl LP wurden mit 1 µl GFPmut II-AT Fragment (Länge 450 bp) von 2,1 ng/µl ( $AT_1$ ) bzw. 0,21 ng/µl ( $AT_2$ ) bzw. 0,021 ng/µl ( $AT_3$ ) und 95 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Die jeweilige Endkonzentration wurde unter Einbeziehung des Faktors f zur Längekorrektur zu der Konzentration des *AGTR*-Fragmentes ins Verhältnis gesetzt ( $f = 450 \text{ bp} : 105 \text{ bp} = 4,285$ ). Beispiel  $AT_1$ :  $(0,021 \text{ ng/µl} : 0,0389 \text{ pg/µl}) : 4,285 = 125,99$

<sup>30</sup> Subtraktion nach Felske: 1. SH: 400 ng Tester mit J21, 25 µg Driver 1. SH: 50 ng Tester mit R21, 26 µg Driver



**Abb. 32** Subtraktion von AT-Fractionen des Testsystems GFPmut II. **(A)** Fragmentverteilung in den Testerfraktionen AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> und in der Driverfraktion D **(B)** DP-1 und DP-2 der Proben AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub> (je 3 µl Gelauftrag); Bande 2 und das mutmaßliche GFPmut II-Fragment wurden sequenziert **(C)** Die Sequenz des Fragments aus Bande 2 stimmt mit Chromosom 16 (-) 77940285-77940529 überein (hellgrau: Subtraktionsprimer R21, dunkelgrau: Differenzierungsbasen, umrandet: PCR-Primer „Chr16-TG“ **(D)** Nachweis von Testfragmenten in den Fraktionen AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> und D vor der Subtraktion

Um zu prüfen, ob es sich um ein differentielles Fragment handeln konnte, das während der Fraktionierung nicht aus der AT<sub>1</sub>-Fraktion aber aus D abgetrennt worden war, wurde eine Kontroll-PCR mit Primern für dieses Fragment durchgeführt (Primerpaar „Chr16-TG“, Abb. 32C). Da das Fragment aus einer MIR-Sequenz (*mammalian wide interspersed repeats*) aus der Klasse der *short interspersed nuclear elements* (SINE, s. u. Tab. 34, Nr. 1) stammte, war es allerdings nicht möglich, Primer zu generieren, die in einer Datenbankrecherche ausschließlich die gewünschte chromosomale Region erkannten. So wurde neben dem AT-Fragment D5S416 auch das Fragment Chr16-TG sowohl in den Fraktionen AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub> als auch D nachgewiesen (Abb. 32D). Es konnte daher nicht ermittelt werden, ob es sich bei Bande 2 in DP-2 um ein differentielles oder ein falsch positives Ereignis handelte. Möglicher Weise stimmte es mit demjenigen Fragment überein, das bereits in der AT<sub>1</sub>-Fraktion und der Driverfraktion D überproportional häufig in Form einer Bande angereichert worden war.

### 3.4.2.3 BCR-ABL Testsystem

Mit diesem Experiment sollte bestimmt werden, ob das differentielle BCR-ABL Fragment in einem Testsystem in der Größenordnung eines einmalig vorkommenden Mse I-Fragmentes durch die Subtraktion isoliert werden kann. Außerdem sollte die Möglichkeit untersucht werden, ob Fragmente, die in Fraktionen in Form von sichtbaren Banden angereichert vorliegen, zu falsch positiven Ergebnissen in der Subtraktion führen können. Es wurden ein GG- und ein TT-Testerpool hergestellt, in denen die BCR-ABL Konzentration in etwa auf ein Zehntel der BCR-ABL Konzentration in Mse I-Repräsentationen aus K562-Zellen eingestellt wurde<sup>31</sup>. Anschließend wurde die Konzentration der Fragmente in den Testerpools in einer quantitativen PCR mit den Primern K562-5'III und -3' bestimmt. Als absoluter Standard diente dabei ein isoliertes BCR-ABL Fragment bekannter Konzentration. Tab. 34 zeigt, dass Konzentrationen von ca. 231 fg/μl im GG-Testerpool und von 467 fg/μl im TT-Testerpool vorlagen (beide grau unterlegt). Im Vergleich zu dem Mse I-Fragment aus *AGTR* (s. o) und unter Einbeziehung des Faktors 1,162, der sich aus dem Längenverhältnis der gemessenen PCR-Produkte von 122 bp (K562) zu 105 bp (AGTR-279) ergibt, lag das BCR-ABL Fragment im GG-Testerpool ca. 5,1fach vor. Im TT-Testerpool entsprach die BCR-ABL Konzentration ca. dem 10,3fachen. Dieser wurde in einem weiter unten beschriebenen Experiment in eine Subtraktion eingesetzt (3.4.3.1.1).

**Tab. 34** Absolute Quantifizierung von BCR-ABL Fragmenten in Testerpools

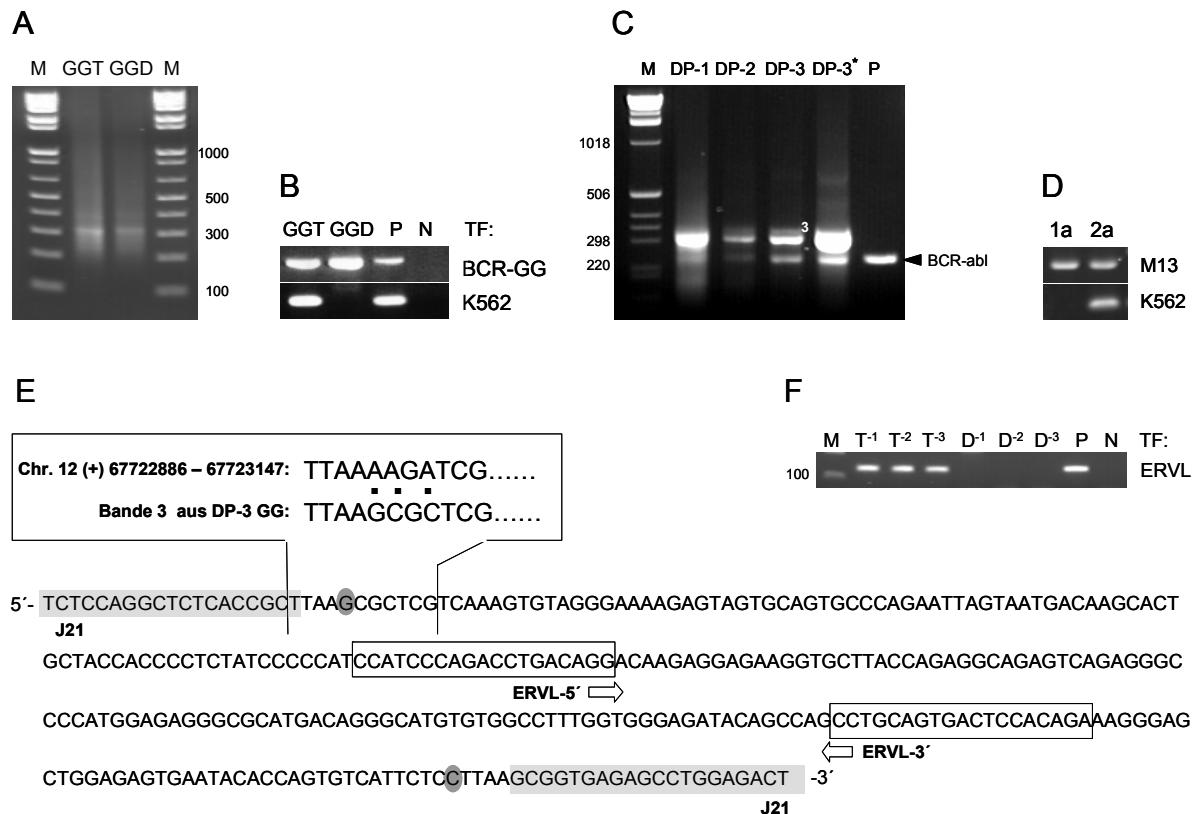
	Standard [ng/ml]	Crossing-Point		Konzentration [ng/ml]		Mittelwert [ng/ml]
		Probe	Replikat	Probe	Replikat	
Leerwert		31,86	-	$1,747 \times 10^{-4}$	-	
Standard 1	106,0	11,22	11,07	102,9	113,1	108,0
Standard 2	10,6	14,69	14,89	11,01	9,656	10,33
Standard 3	1,06	18,21	18,34	1,138	1,051	1,094
Standard 4	$1,06 \times 10^{-1}$	22,00	21,99	$9,979 \times 10^{-2}$	$1,004 \times 10^{-1}$	$1,001 \times 10^{-1}$
Standard 5	$1,06 \times 10^{-2}$	25,55	25,30	$1,010 \times 10^{-2}$	$1,191 \times 10^{-2}$	$1,101 \times 10^{-2}$
Testerpool GG		20,67	20,71	$2,336 \times 10^{-1}$	$2,287 \times 10^{-1}$	$2,312 \times 10^{-1}$
Testerpool TT		19,64	19,55	$4,544 \times 10^{-1}$	$4,801 \times 10^{-1}$	$4,673 \times 10^{-1}$

Sowohl in der Testerfraktion als auch in der Driverfraktion war auf einer Höhe von etwas über 300 bp eine Bande zu erkennen (Abb. 33A). In beiden Fraktionen wurde das Fragment BCR-GG nachgewiesen, das differentielle Fragment BCR-ABL GG (Testfragment „K562“) wurde nur in der Testerfraktion nachgewiesen (Abb. 33B). Es wurden drei Depletionsrunden durchgeführt, wobei in der dritten Runde in einem Ansatz – wie in beiden Runden zuvor – die GG-Driverfraktion (DP-3, Abb. 33C) und einem anderen Ansatz der unfractionierte Driverpool LP eingesetzt wurde<sup>32</sup> (DP-3\*, Abb. 33C).

<sup>31</sup> Herstellung wie unter 2.9.4 beschrieben, Endverdünnung im Testerpool entsprach  $10^{-6}$

<sup>32</sup> Herstellung des Testerpools nach 2.9.3, Konzentration des BCR-ABL Fragments in etwa wie in K562-Zellen. Fraktionierung mit LibGm, Subtraktion nach Lisitsyn

In DP-3 traten zwei Banden auf, von der eine ca. 300 bp umfasste (Bande 3, Abb. 33C) und die andere sich auf gleicher Höhe befand, wie die Positivkontrolle, ein isoliertes BCR-ABL Fragment der Länge 238 bp. Diese Banden traten ebenfalls in der Probe DP-3\* auf, sie waren hier stärker angereichert worden, jedoch hoben sich die Banden nicht so deutlich vom Hintergrund ab, wie in DP-3. Beide Banden aus DP-3 wurden extrahiert und die Fragmente mittels Plasmid-Vektoren in kompetente Bakterien eingebracht.



**Abb. 33** Subtraktion von GG-Fractionen des BCR-ABL Testsystems. **(A)** Fragmentverteilung in den Fractionen GGT (Tester) und GGD (Driver) nach einer Reamplifizierung **(B)** Nachweis der Fragmente BCR-GG und BCR-ABL GG (K562) in den Fractionen nach einer Reamplifizierung **(C)** Produkte der 1. – 3. Depletionsrunde (DP-1, DP-2, DP-3; \*: Driver der 3. SH nicht fraktioniert). Die DNA aus Bande 3 und der mutmaßlichen BCR-ABL Bande wurde extrahiert und in *E. coli* kloniert **(D)** Screening-PCR der Klone 1a (Insert aus Bande 3) und 2a (Insert aus mutmaßlichem BCR-ABL Fragment) mit den Primerpaaren M13 und K562 **(E)** Sequenz des 306 bp langen DNA-Fragments aus Bande 3. Abweichungen zu den Basen 67722886-67723147 von Chromosom 12 sind durch Punkte gekennzeichnet (hellgrau: Adaptersequenz J21, dunkelgrau: Differenzierungsbasen, umrandet: spezifisches Primerpaar ERVL) **(F)** Nachweis des Fragmentes ERVL in Verdünnungen (1:10 - 1:1000) der GG-Fractionen vor der Subtraktion (T: Tester, D: Driver). M: Längenstandard, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, TF: Testfragment

Abb. 33D zeigt eine Screening-PCR mit den Primerpaaren M13 und K562 auf den Klon 1a, der mit dem Fragment aus Bande 3 transfiziert worden war, und Klon 2a, der mit dem mutmaßlichen BCR-ABL Fragment transfiziert worden war. Während beide Klone ein Signal für die M13-PCR zeigen, zeigte nur Klon 2a ein Signal für das BCR-ABL spezifische Screening mit K562. Hiermit wurde

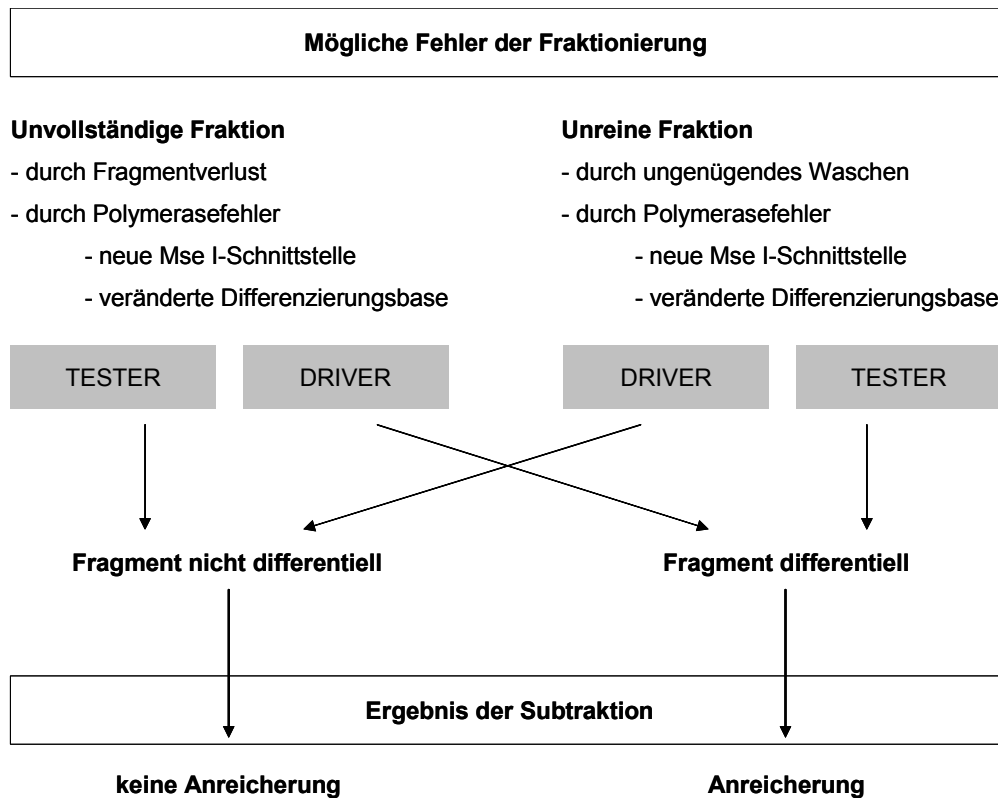
gezeigt, dass das humane Translokationsfragment BCR-ABL mit der Subtraktion von Fraktionen nachgewiesen werden kann, wenn es ca. 5fach häufiger in einer DNA-Probe vorliegt, als ein einmalig vorkommendes Fragment.

Um die Herkunft von Bande 3 zu klären, wurde das Fragment aus Klon 1a sequenziert. Es stammte aus einem *long terminal repeat* (LTR) der Familie ERVL der humanen endogenen Retroviren von Chromosom 12 (Tab. 34, Nr. 2). Auffällig war, dass drei Basen, unter ihnen eine der beiden Differenzierungsbasen, im Vergleich zu der Sequenz aus der Datenbank verändert waren, so dass es nun der GG-Fraktion zugehörte (vormals AG, Abb. 33E). Falls diese Veränderung auf einen Fehler der DNA-Polymerase während der Fraktionierung zurückzuführen war, der nur im Tester stattgefunden hatte, handelte es sich bei Bande 3 nicht um ein falsch positives Ereignis, sondern um einen tatsächlichen Unterschied zwischen Tester und Driver und somit um ein korrekt identifiziertes differentiell Fragment. Um dies zu prüfen wurde eine Kontroll-PCR mit dem Primerpaar „ERVL“ (umrandet, Abb. 33E) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, die Primerbindestellen in der Sequenz so zu wählen, dass sie keine Übereinstimmung mit den ERVL-Wiederholungen anderer chromosomaler Regionen aufwiesen. Mit Hilfe dieser Primer konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem 306 bp langen Fragment um ein differentiell Fragment handelte, das nur in der GG-Testerfraktion, nicht aber in der GG-Driverfraktion vorkam (Abb. 33F). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Banden von ca. 300 bp in der Tester- und Driver-Fraktion, die bereits in den Fraktionen sichtbar waren, mit dem Fragment aus Bande 3 übereinstimmten. Daher wurde gefolgert, dass überproportional häufig vorliegende Fragmente in den Fraktionen wahrscheinlich nicht dazu neigen, in der Subtraktion angereichert zu werden.

### 3.4.3 Falsch positive Subtraktionsergebnisse

In den Subtraktionen wurden häufig Banden angereichert, deren Länge nicht mit der Länge des jeweils zugefügten differentiellen Fragments übereinstimmte. Diese Banden stammten entweder von Fragmenten, die sowohl im Tester als auch im Driver enthalten waren, womit sie falsch positive Ergebnisse der Methode darstellten. Oder die Banden hatten ihre Ursache in Unterschieden zwischen Tester und Driver, die während der Fraktionierung entstanden waren. In diesem Fall würde es sich um differentielle Fragmente handeln, deren Anreicherung als „Hintergrund“ (bzw. „Rauschen“) der Methode gewertet werden müsste. Möglicherweise wurden durch Fehler während der Fraktionierung, die zu einer unvollständigen Driver-Fraktion oder zu einer unreinen Tester-Fraktion führten, differentielle Fragmente generiert. Denkbar wäre beispielsweise, dass zu stringente Fraktionierungsbedingungen bzw. ungenügende Waschbedingungen der paramagnetischen Partikel zu solchen Unterschieden führen können. Der fehlerhafte Einbau von Nukleotiden durch die DNA-Polymerase während einer Amplifikation könnte dazu führen, dass Sequenzen durch veränderte Differenzierungsbasen oder neu entstandene Mse I-Schnittstellen die Fraktion wechseln und so als differentielle Fragmente in Erscheinung treten (Abb. 34).





**Abb. 34** Fehler bei der Fraktionierung können zu zusätzlichen oder fehlenden Fragmenten in den Tester- und Driver-Fractionen führen. Differentielle Fragmente, die nur im Tester vorkommen, können in der Subtraktion angereichert werden.

Um die Mechanismen der Bandenanreicherung während der Subtraktion zu untersuchen, wurden 29 Banden aus elf Subtraktionen kloniert und sequenziert (Tab. 35). Die Sequenzen wurden mit der elektronischen Datenbank NCBI *Blast Search* verglichen und ihre Herkunft sowie etwaige Abweichungen von den dort abgelegten Sequenzen bestimmt. Die chromosomalen Positionen von humanen Sequenzen und das Vorkommen von Wiederholungssequenzen (engl.: *repeats*) wurden mit der Suchmaschine USCS *Human Genome Bioinformatics/BLAT Search* identifiziert. Banden, in denen die differentiellen Fragmente GFPmut I, GFPmut II oder BCR-ABL erfolgreich angereichert worden waren, wurden nicht in die Tabelle aufgenommen.

**Tab. 35** (Falsch) positive Ergebnisse von Subtraktionsexperimenten

Nr.	Fraktion (Testsystem)	humanes Chromosom bzw. Organismus	Repeat, Familie, Klasse bzw. bakterielles Gen	Bemerkung*
1	AT (GFP II)	Chr. 16: (-) 77940285 - 77940529	zweite Hälfte MIRb, MIR, SINE	TG-Fragment in AT-Fraktion (evt. differentiell)
2	GG (BCR-ABL)	Chr. 12: (+) 67722886 – 67723147	LTR33, ERVL, LTR	Pos. 4 (Differenzierungsbase): A→G, differentiell Fragment
3	TT (PT1590)	Chr. 18: 19040037 – 19040214	erstes Viertel MLT1C, MaLR, LTR	GG-Fragment in TT-Fraktion (evt. differentiell)
4	GG (PT1590)	Chr. 22 (-) 42115376 - 42115568	erste Hälfte MIRb, MIR, SINE	
5	TT (BCR-ABL)	Chr. 6: (-) 44739545 - 44739766	erste Hälfte L2, L2, LINE	
6	TT (BCR-ABL)	Chr. M: (-) 4472 - 4700 Chr. 1 (-) 554884 - 555112	—	je 98,7% Übereinstimmung, Pos. 2 G→A (neue Schnittstelle); um 59 bp verkürztes TT-Fragment
7	TT (BCR-ABL)	Chr. 16: (+) 33871368 - 33871669	SSU-rRNA, HSA, rRNA	neue Schnittstelle, um 90 bp verkürztes TT-Fragment
8	TT (BCR-ABL)	nicht eindeutig zuzuordnen	Satellit 2, HSA TII, simple repeat	über 95% Übereinstimmung mit vielen Regionen
9	AA (BCR-ABL)	Chr. 2: 169661239-169661407	L2, L2, LINE	22 unbekannte Basen am 5'-Ende
10	AA (BCR-ABL)	nicht eindeutig zuzuordnen	L1PA3, L1, LINE	über 95% Übereinstimmung mit vielen Regionen
11	AA (BCR-ABL)	Chr. 12: (+) 18938026 - 18938215	L1PA8A, L1, LINE	
12	AA (BCR-ABL)	Chr. 17: (+) 21166912 - 21167209	z. T. MLT1C, MaLR, LTR	
13	AA (BCR-ABL)	wahrscheinlich Chr. 1: (-) 142378829 - 142379094	L1PA4, L1, LINE	96,3% Übereinstimmung, zahlreiche weitere Regionen über 94%
14	TT (BCR-ABL)	Chr. X: (+) 98384483 - 98384870	L1PB3, L1, LINE	
15	AA (BCR-ABL)	Chr. 9: (+) 93773262 - 93773519	z. T. MIR, MIR, SINE	
16	TT (GFP I)	Plasmidsequenz**		
17	TT (BCR-ABL)	<i>Pseudomonas</i>		
18	TT (BCR-ABL)	Plasmidsequenz**		
19	AA (PT1590)	<i>E. coli</i> K12 MG1655	Repressor von hyc und hyp Operon	
20	AA (PT1590)	<i>E. coli</i> K12 MG1655	Peptidtransporter Untereinheit	
21	TT (PT1590)	<i>E. coli</i> K12 MG1655	konserviertes hypothetisches Protein	
22	TT (PT1590)	<i>E. coli</i> K12 MG1655	NAD Synthetase	
23	TT (BCR-ABL)	Plasmidsequenz**		
24	AA (BCR-ABL)	nicht zuzuordnen		Teile viral, Teile bakteriell
25	AA (BCR-ABL)	<i>E. coli</i> K12 MG1655		AG-Fragment in AA-Fraktion (evt. differentiell)
26	AA (BCR-ABL)	<i>Pseudomonas</i>		
27	AA (BCR-ABL)	<i>Pseudomonas</i>		
28	TT (BCR-ABL)	Plasmidsequenz**		
29	TT (BCR-ABL)	<i>E. coli</i> K12 MG1655		

grau unterlegt: humaner Ursprung, weiß unterlegt: bakterieller Ursprung; \*: Differenzierungsbasen stimmen mit der Fraktion überein, wenn keine Angabe; \*\*: Übereinstimmung mit verschiedenen Klonierungsvektoren

Die angereicherten Banden stammten in etwa zur Hälfte von humanen (15/29, grau unterlegt) bzw. bakteriellen Sequenzen (14/29). Die große Mehrheit der Sequenzen (26/29) trug die Differenzierungsbasen der jeweiligen Tester- und Driverfraktionen. Es wurde angenommen, dass es sich in den meisten Fällen wahrscheinlich nicht um differentielle Fragmente handelte, obwohl diese Banden eventuell von Verlusten im Driver herrührten. Dieser Umstand wurde untersucht und konnte ausgeschlossen werden (siehe dazu 3.4.3.1.1). Zwei TT-Fragmente (Tab. 35, Banden 6 und 7) wiesen im Vergleich mit der Datenbank einen Basenaustausch auf, wodurch eine Mse I-Schnittstelle entstand und die Fragmente um 90 bzw. 59 bp verkürzt waren. Möglicherweise handelte es sich hier um bisher nicht beschriebene *single nucleotide* Polymorphismen (SNPs) oder um Polymerasefehler bei der Amplifikation der Fragmente. Da in beiden Fällen das in der Datenbank abgelegte längere Fragment ebenfalls der TT-Fraktion zugehörte, wurde jedoch davon ausgegangen, dass es sich um falsch positive Ergebnisse der Subtraktion handelte. Auch hier wäre nur der Verlust dieser Fragmente im Driver eine mögliche Ursache.

Das bereits erwähnte Fragment aus Bande 2 trug ebenfalls die Differenzierungsbasen der verwendeten GG-Fraktionen. Seine Sequenz wies jedoch in einer Differenzierungsbase eine Abweichung von der ansonsten 100%igen Übereinstimmung mit einem AG-Fragment von Chromosom 12 auf (Tab. 35, Nr. 2). Möglicherweise war es an dieser Stelle durch einen Polymerasefehler zu einem Basenaustausch gekommen und das Fragment daher der GG-Testerfraktion zugeteilt geworden. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotidprimern konnte dieses Fragment in einer Kontroll-PCR eindeutig als differentielles Fragment zwischen Tester und Driver identifiziert werden (3.4.2.3).

Die Fragmente aus Banden 1, 3 und 25 gehörten nicht der jeweiligen Tester- und Driver-Fraktion an, weshalb angenommen wurde, dass es sich um differentielle Fragmente handeln könnte, die durch die Fraktionierung aus dem Driver, nicht aber aus dem Tester abgetrennt worden waren („evt. differentiell“). Damit würde es sich um Ereignisse handeln, die auf Grund einer nicht vollkommenen Trennung der Fraktionen in der Subtraktion angereichert wurden. Die jeweils verwendeten Tester- und Driverpools wurden aus folgenden Gründen nicht auf das Vorhandensein dieser Fragmente untersucht: Für die humanen Wiederholungssequenzen aus Bande 1 und 3 konnten in einer elektronischen Datenbankrecherche keine spezifischen PCR-Primer generiert werden und die bakterielle Sequenz aus Bande 25 war auf Grund von Kontaminationen der PCR-Enzyme durch bakterielle DNA nicht spezifisch nachzuweisen. Diese Kontaminationen resultieren aus der rekombinanten Herstellung der Enzyme in Bakterien (vergleiche Diskussion).

Die Sequenzen der meisten Banden (25/29) wiesen zwischen 98 und 100% Übereinstimmung mit den in den Datenbanken abgelegten Sequenzen auf. Die geringen Abweichungen von 100%igen Übereinstimmungen erklärten sich durch einzelne Basen, die nicht mit der abgelegten Sequenz übereinstimmten und auch nicht mit bekannten *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) korreliert werden konnten. Es erschien wahrscheinlich, dass es sich hierbei um Fehler der DNA-Polymerase

handelte, die während des Fraktionierungs-Protokolls oder während einer Amplifikation nach der subtraktiven Hybridisierung eingefügt worden waren.

Mit Ausnahme der Sequenz aus Bande 6, die sowohl mit mitochondrialer DNA (Chr. M) als auch mit Chromosom 1 98,7% Übereinstimmung zeigte, gehörten alle humanen Fragmente zu der Gruppe der Wiederholungssequenzen. Trotz deren weiten Verbreitung im Genom konnte die Herkunft der meisten Fragmente eindeutig bestimmt werden, da sie nur für eine Region eine Übereinstimmung von > 98% zeigten (Abweichungen von diesem Prozentsatz werden in Tab. 35 aufgeführt). Die Fragmente aus Banden 8, 10 und 13 konnten keiner chromosomalen Region eindeutig zugeordnet werden, da sie mit bis zu vielen dutzend verschiedenen Regionen über 95% und mit weiteren Regionen geringere Übereinstimmungen aufwiesen. Bande 8 stammte von einem Satelliten-Element (Klasse: *simple repeat*), die anderen beiden von einem Element der L1-Familie der *long interspersed nuclear elements* (LINE). Diese Klasse der Wiederholungssequenzen war mit 6/14 Sequenzen am häufigsten vertreten. SINE- und LTR-Wiederholungen fanden sich jeweils mit 3/14 Sequenzen und je einmal wurde ein angereichertes Fragment als Teil eines *rRNA-repeats* bzw. eines *simple repeats* identifiziert (Tab. 36). Die bakteriellen Sequenzen stammten hauptsächlich von dem Sicherheitsstamm *E. coli* K12 MG1655 (6/14) und Plasmidsequenzen ab (4/14), drei weitere Sequenzen zeigten Übereinstimmungen mit dem Genom von *Pseudomonas spec.*. Die Herkunft der Sequenz aus Bande 24 konnte nicht ermittelt werden, da sie nur kurze Übereinstimmungen mit verschiedenen bakteriellen und viralen Genomen aufwies.

**Tab. 36** Einteilung von 29 (falsch) positiven Ereignissen

Humane Wiederholungssequenzen (14 von 15 humanen Sequenzen)							
Klasse	LINE (Anzahl)		SINE (Anzahl)	LTR (Anzahl)		<i>rRNA-repeat</i>	<i>simple repeat</i>
Familie	L1 (4)	L2 (2)	MIR (3)	ERVL (1)	MaLR (2)		HSA TII
Name	L1PA3 L1PA8A L1PA4 L1PB3	L2 L2	MIRb MIRb MIR	LTR33	MLT1C MLT1C	SSU- rRNA_HSA	Satellit 2
Bakterielle Sequenzen (Anzahl: 14)							
Organismus	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (6)		<i>Pseudomonas spec.</i> (3)	Plasmidsequenzen (4)		unbekannte Herkunft (1)	

### 3.4.3.1 Eliminieren von falsch positiven Ergebnissen

#### 3.4.3.1.1 Verwendung eines Drivers aus mehreren Fraktionen

Dass hauptsächlich Fragmente mit tester- und driverspezifischen Differenzierungsbasen in den falsch positiven Banden angereichert wurden, konnte auf einen Verlust einzelner Fragmente in den Driverfraktionen als Ursache hindeuten. Daher wurde untersucht, ob durch die Verwendung eines Gemisches aus drei Driverfraktionen weniger falsch positive Banden in der Subtraktion entstanden als bei der Verwendung nur einer Driverfraktion. Zusätzlich sollte ein Verhältnis zwischen Tester- und

Drivermenge bestimmt werden, durch das die Effizienz der subtraktiven Hybridisierung möglicherweise gesteigert werden konnte. Dies sollte anhand der Anreicherung des differentiellen BCR-ABL Fragmentes beurteilt werden.

Es wurde je drei Tester- (T1, T2, T3) und Driverfraktionen (D1, D2, D3) des BCR-ABL TT-Testsystems angefertigt (Abb. 35A). In allen TT-Fraktionen wurde das Fragment BCR-TT nachgewiesen, in den Testerfraktionen außerdem noch das differentielle Fragment BCR-ABL TT (Primerpaar „K562“, Abb. 35B). Die Ausgangsprobe für die Testerfraktionen war ein Testerpool, in dem die Konzentration des BCR-ABL Fragmentes durch eine quantitative PCR auf 467 fg/μl bestimmt werden konnte, was in etwa dem 10fachen des Mse I-Fragmentes aus *AGTR* entsprach (siehe oben, Tab. 34). Anschließend wurden drei Depletionsrunden (1. – 3. Subtraktive Hybridisierung, SH) durchgeführt. Als Driver wurden jeweils 40 μg DNA aus einer Fraktion (D3) bzw. aus drei Fraktionen (D1-3) verwendet<sup>33</sup>. Für den Tester wurden die Fraktionen T1, T2 und T3 zu gleichen Teilen gemischt und in variablen Mengen nach dem folgenden Schema in die Subtraktion eingesetzt. Dabei entsprach die Mengenangaben für Ansatz a\* in etwa denen aus dem Protokoll von Lisitsyn (1. SH: 400 ng, 2. SH: 50 ng, 3. SH: 100 – 400 pg).

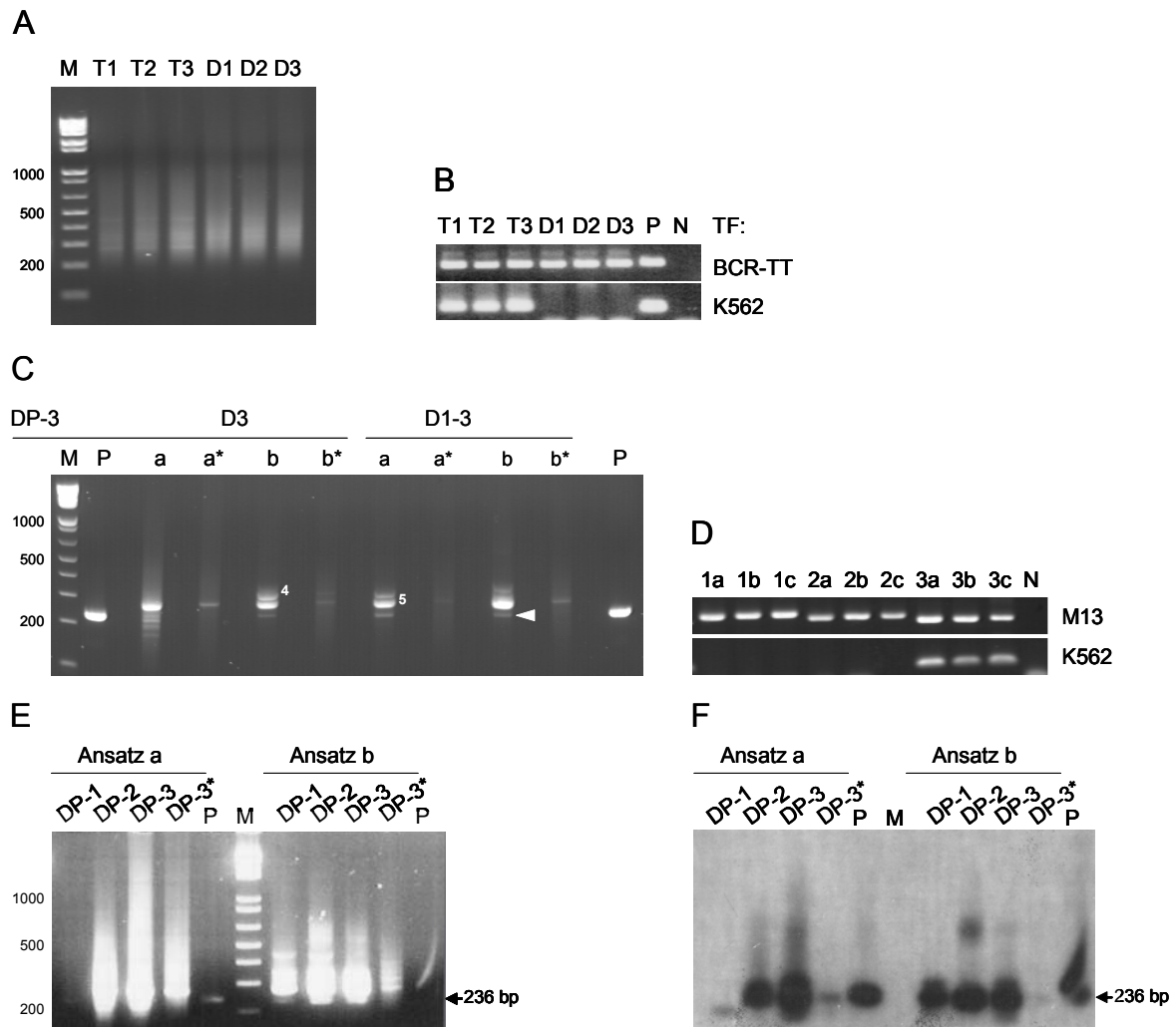
Ansatz a	1. SH: 400 ng	2. SH: 50 ng	3. SH: 10 ng
Ansatz a* (aus DP-2a)	“	“	3. SH: 500 pg
Ansatz b	1. SH: 1 μg	2. SH: 400 ng	3. SH: 50 ng
Ansatz b* (aus DP-2b)	“	“	3. SH: 500 pg

Es konnte kein wesentlicher Unterschied zwischen Proben festgestellt werden, die mit den Drivern D3 oder D1-3 hergestellt wurden. Die Produkte der dritten Depletionsrunde (DP-3) aus allen Ansätzen zeigten hauptsächlich drei wiederholt auftretende Banden in unterschiedlich starker Ausprägung (Abb. 35Abb. 35C), die auf einer Höhe von ca. 240 bis 320 bp eng beieinander lagen. Die mittlere Bande (Bande 5, oben: Bande 4) war in allen Fällen am stärksten ausgeprägt, in den Proben a\* und b\* (D3 und D1-3) war sie als einzige sichtbar. Die untere Bande (Pfeilspitze) zeigte eine vergleichbare Länge, wie das BCR-ABL Fragment in der Positivkontrolle. Da unabhängig von dem verwendeten Driver die gleichen Banden in der Subtraktion angereichert worden waren, wurde ausgeschlossen, dass es sich bei den angereicherten Banden um differentielle Ereignisse zwischen Tester und Driver handelte, die durch den Verlust von Fragmenten in einer Driverfraktion entstanden waren.

Zur Aufklärung der Identität der drei Banden wurden sie aufgereinigt und mit Hilfe von Plasmid-Vektoren in *E. coli* eingebracht. Einzelne Klone wurden einer Screening-PCR mit den Primerpaaren M13 und K562 unterzogen (Abb. 35D). Während alle Klone eine spezifische M13-Bande zeigten, gaben nur die Klone 3a, 3b und 3c, in denen das mutmaßliche BCR-ABL Fragment vermehrt worden

<sup>33</sup> Fraktionierung nach etabliertem Protokoll wie unter 7.3, Subtraktion nach Lisitsyn

war, ein BCR-ABL spezifisches Signal mit dem Primerpaar K562, wodurch die erfolgreiche Subtraktion des differentiellen Fragmentes BCR-ABL gezeigt werden konnte. Eine Sequenzierungsreaktion ergab, dass es sich bei den Banden 4 und 5 um TT-Fragmente aus *Pseudomonas* handelte (vergleiche Tab. 35, Nr.17 und 18).



**Abb. 35** Subtraktion des BCR-ABL Testsystems (**A**) Fragmentverteilung in TT-Fractionen T (Tester) und D (Driver) nach einer Reamplifizierung (**B**) Nachweis der Fragmente BCR-TT und BCR-ABL TT (Primerpaar K562) in den Fractionen nach einer Reamplifizierung (**C**) Produkte der 3. Depletionsrunde (DP-3) aus Ansatz a und b (Beschreibung s. Text): Vergleich zwischen einer Driver-Fraction (D3) bzw. drei Driver-Fractionen (D1-3). Die Banden 4, 5 und das mutmaßliche BCR-ABL Fragment (Pfeilspitze) wurden aus dem Gel extrahiert und in *E. coli* kloniert. (**D**) Screening-PCR mit den Primerpaaren M13 und K562 (Klone 1a-c: Bande 4; 2a-c: Bande 5; 3a-c: mutmaßliches BCR-ABL Fragment) (**E**) Analytisches Agarosegel von je 2 µl DP-1, DP-2 und DP-3 der Ansätze a/a\* bzw. b/b\* aus den Proben D3 (Positivkontrolle P: BCR-ABL Fragment; 236 bp) (**F**) Chemilumineszenz-Reaktion auf einem Southern-Blot der Proben aus (E) nach Hybridisierung mit einer BCR-ABL spezifischen Sonde

Anschließend wurde untersucht, welches Mengenverhältnis von Tester zu Driver eine stärkere Anreicherung des BCR-ABL Fragments zur Folge hatte. Daher wurden je 2 µl DP-1, DP-2 und DP-3 der Proben D3a/a\* und D3b/b\* nach einer Gelelektrophorese in einem Southern-Blot auf eine

Nylonmembran übertragen und dort mit einer DNA-Sonde gegen das BCR-ABL Fragment hybridisiert. Der Nachweis der hybridisierten Sonde erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion (Abb. 35F). In den Proben aus Ansatz a gab es von DP-1 bis DP-3 eine deutliche Zunahme des Signals, in den Proben aus Ansatz b war das Signal bereits in DP-1 fast ebenso stark wie in DP-2 und DP-3. In den Proben DP-3a\* und DP-3b\* gab es nur ein minimales Signal der Sonde, was darauf hin deutete, dass eine Testermenge von 500 pg nicht ausreichte, um das Fragment in der 3. SH weiter anzureichern. Da in den Proben aus Ansatz b insgesamt weniger Hintergrundsignal die Fluoreszenz der BCR-ABL Bande störte (Abb. 35E) und sie schneller angereichert wurde, wurde das Vorgehen nach Ansatz b, in dem die Testermenge im Vergleich zu dem Protokoll nach Lisitsyn etwas erhöht worden war, favorisiert.

#### **3.4.3.1.2 Verwendung von $C_0t$ -1 DNA**

Es sollte versucht werden, die Anreicherung von repetitiven Sequenzen zu verhindern, indem ihr Anteil an Driversequenzen während der subtraktiven Hybridisierung erhöht wurde. Dies wurde zum einen durch eine absolute Erhöhung der Drivermenge und zum anderen durch die Erhöhung der relativen Menge an repetitiven Sequenzen durch die Zugabe von humaner  $C_0t$ -1 DNA in den Driver versucht. Die Renaturierung zur Doppelsträngigkeit von DNA wird mit dem  $C_0t$ -Wert, dem Produkt aus der Konzentration von Nukleinsäuren und der Zeit, beschrieben. Humane  $C_0t$ -1 DNA enthält hauptsächlich hoch repetitive Sequenzen wie *Alu*- und LINE-Wiederholungen.

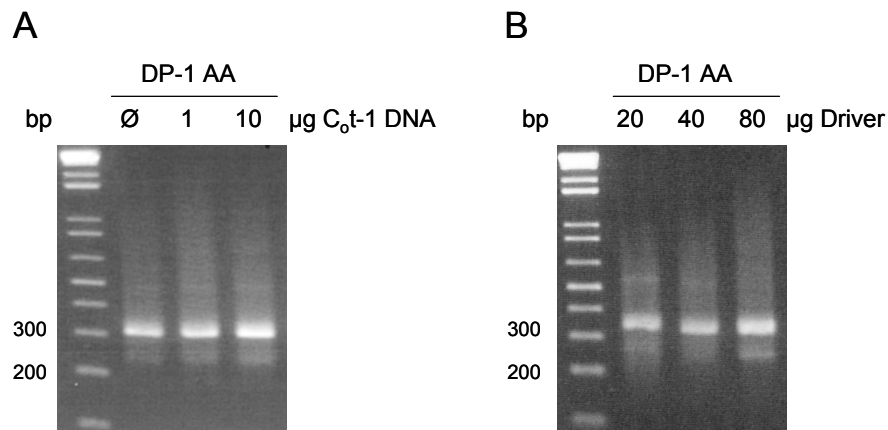
Eine Depletionsrunde von AA-Fraktionen des BCR-ABL Testsystems wurde ohne und mit der Zugabe von humaner  $C_0t$ -1 DNA (Invitrogen) in den Driver (1  $\mu$ g bzw. 10  $\mu$ g) durchgeführt<sup>34</sup>. In einem weiteren Experiment wurde die Menge des Drivers zwischen 40, 60 und 80  $\mu$ g pro Subtraktionsansatz variiert und ebenfalls eine Depletionsrunde durchgeführt<sup>35</sup>.

In allen Ansätzen waren Banden von ca. 300 bp stark und Banden von ca. 230 bp schwach angereichert worden (Abb. 36). Die Bande von 230 bp war nach einer Zugabe von 10  $\mu$ g deutlicher ausgeprägt. Sequenzierungsreaktionen der Banden ergaben, dass es sich bei der größeren Bande (305 bp, Tab. 35, Nr. 13) um eine L1PA4-Wiederholung und bei der kleineren Bande (230 bp, Tab. 35, Nr. 11) um eine L1PA8A-Wiederholung der L1-Familie (LINE) handelte. Beide Sequenzen konnten keiner chromosomalen Lokalisation eindeutig zugeordnet werden, da sie jeweils mit mehreren Dutzend Stellen im Genom über 95% Übereinstimmung aufwiesen. Demnach konnte weder durch die Zugabe von  $C_0t$ -1 DNA noch durch die Erhöhung der Drivermenge die Anreicherung von repetitiven Sequenzen in den Produkten der ersten Depletionsrunde vermindert werden.

---

<sup>34</sup> Subtraktion nach Felske, 1. SH: 500 ng Tester

<sup>35</sup> Subtraktion nach Lisitsyn, 1. SH: 400 ng Tester



**Abb. 36** Verwendung von  $C_0t-1$  DNA und einer gesteigerten Drivermenge zur Unterdrückung von falsch positiven Ereignissen **(A)** Produkte einer Depletionsrunde von AA-Fraktionen des BCR-ABL Testsystems ohne die Zugabe ( $\emptyset$ ) bzw. mit der Zugabe von 1 bzw. 10  $\mu\text{g}$   $C_0t-1$  DNA in den Driver **(B)** Produkte einer Depletionsrunde von AA-Fraktionen des BCR-ABL Testsystems unter Verwendung von 20, 40 bzw. 80  $\mu\text{g}$  Driver

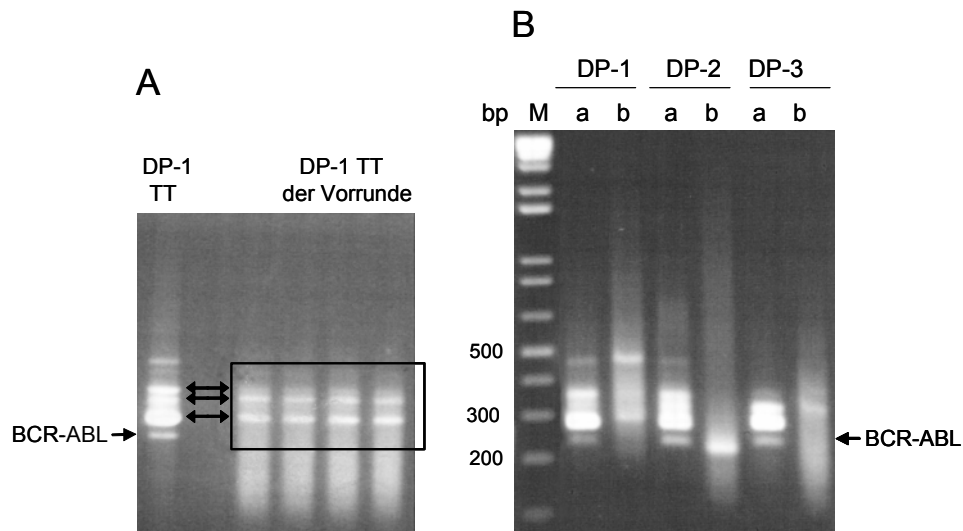
### 3.4.3.1.3 Verwendung von fraktionsspezifischen repetitiven DNA-Sequenzen

In einem weiteren Versuch, die Anreicherung von Fragmenten aus repetitiven Sequenzen in der Subtraktion zu verhindern, sollten sie vor einer Subtraktion gezielt angereichert und anschließend dem Driver beigemischt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Depletionsrunde zwischen zwei TT-Driverfraktionen durchgeführt („Vorrunde“), die angereicherten Banden reamplifiziert und diese in der folgenden Subtraktion dem Driver zugegeben. Es wurden hierfür die in 3.4.3.1.1 beschriebenen Fraktionen verwendet und das Ergebnis mit der entsprechenden Subtraktion von TT-Fraktionen aus jenem Experiment verglichen (Driver D1-3, Ansatz a).

Für die Vorrunde wurden 400 ng der TT-Driverfraktion D1 mit dem Oligonukleotid-Adapter J21 ligiert und mit 40  $\mu\text{g}$  der TT-Driverfraktion D2 in eine Depletionsrunde nach Lisitsyn eingesetzt. Das Produkt DP-1 der Vorrunde zeigte drei angereicherte Fragmente der Längen ca. 270 bp, 320 und 350 bp. Sie liefen in einem analytischen Agarosegel auf identischer Höhe mit drei Banden in DP-1, das ohne Vorrunde durchgeführt wurde<sup>36</sup> (Abb. 37A, Doppelpfeile). Die Banden wurden aus dem Gel extrahiert (in Form eines Rechtecks) und reamplifiziert.

<sup>36</sup> DP-1 D1-3/Ansatz a aus 3.4.3.1.1





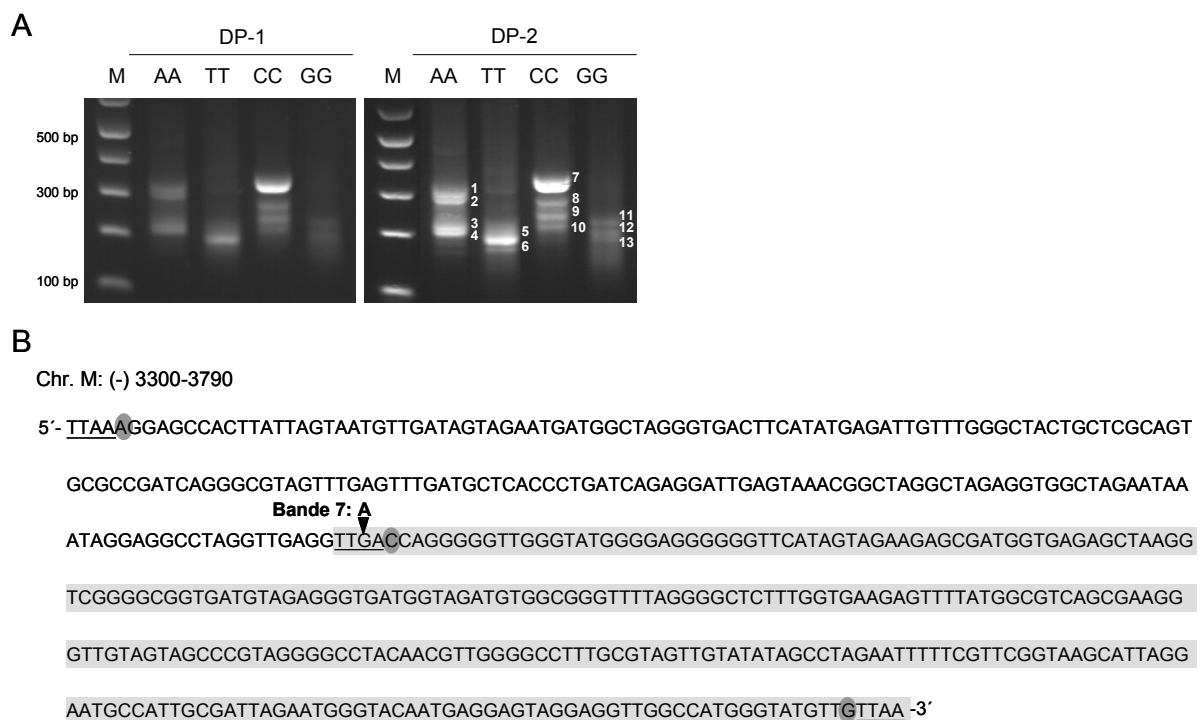
**Abb. 37** Verwendung von fraktionsspezifischen repetitiven DNA-Sequenzen zur Unterdrückung ihrer Anreicherung in der Subtraktion **(A)** Gewinnung von TT-Fraktion spezifischen repetitiven Sequenzen aus einer Depletionsrunde (DP-1) zwischen Driver und Driver in einer Vorrunde zur eigentlichen Subtraktion. Die angereicherten Banden wurden mit DP-1 aus Tester und Driver verglichen (Doppelpfeile) und extrahiert (Rahmen) **(B)** Produkte aus drei Depletionsrunden der Fraktionen TT ohne (a) bzw. mit Zugabe von fraktionsspezifischen repetitiven Sequenzen (b) in den Driver

Anschließend wurden drei Depletionsrunden nach Lisitsyn durchgeführt, in denen der Driver aus jeweils 30 µg TT-Driverfraktionen D1-3 und 30 µg der reamplifizierten Banden aus der Vorrunde bestand. Für die 1. SH wurden 400 ng Tester (T1-3) mit dem Adapter R21 verwendet, für die 2. SH 50 ng (J21) und für die 3. SH 10 ng (R21), was dem Ansatz a des Experiments aus 3.4.3.1.1 entsprach<sup>37</sup>. Abb. 37B zeigt die Produkte der Depletionsrunden DP-1, DP-2 und DP-3 jeweils im Vergleich mit den Produkten des Ansatzes a aus 3.4.3.1.1. Nach der Zugabe der in einer Vorrunde angereicherten Sequenzen waren in allen Produkten weniger Banden erkennbar. Es gab keine Bande, die in den drei Depletionsprodukten gleichermaßen auftauchte. Während in DP-1 vor allem eine ca. 480 bp große Bande und in DP-2 eine 200 bp große Bande angereichert wurden, war in DP-3 eine Bande der Länge von ca. 320 bp angereichert worden. Die falsch positiven Banden in den Produkten aus dem Vergleichsexperiment waren durch die Zugabe der Banden aus der Vorrunde deutlich unterdrückt worden. Offenbar stellte dies jedoch keine Verbesserung für die Detektion des differentiellen Fragments BCR-ABL dar (3.4.3.1.1B, Pfeil), da es in keinem der drei Produkte angereichert werden konnte.

<sup>37</sup> Subtraktion nach Lisitsyn, Vorrunde: 400 ng Driver wurden mit J21 ligiert und mit 40 µg Driver subtrahiert, Extraktion der Banden des Depletionsprodukts, Reamplifizierung mit J21 bei 60°C und 25 Zyklen. 1. SH: 400 ng Tester, R21, 20 µg Reamplifizierung und 20 µg Driver, 2. SH: 50 ng Tester, J21, 20 µg Reamplifizierung und 20 µg Driver, 3. SH: 10 ng Tester, R21, 30 µg Reamplifizierung und 30 µg Driver

### 3.4.4 Identifizierung eines mutmaßlichen Translokationsbruchpunktes

Um in der Zelllinie PT1590, die aus einem Primärtumor eines Patienten mit Ösophaguskarzinom stammt (Hosch, Kraus et al. 2000), Fragmente mit Translokationsbruchpunkten zu identifizieren, wurden ihre Einfachen Fraktionen AA, TT, CC und GG mit denen eines Driverpools aus mikrodisezierten Normalzellen eines Lymphknotens des Patienten hergestellt und in eine Subtraktion eingesetzt<sup>38</sup>. Abb. 38A zeigt die Produkte der ersten und zweiten Depletionsrunde, die auf einem Agarosegel aufgetrennt wurden (DP-1 und DP-2). Bis auf eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den Banden in DP-1 und DP-2 zu erkennen. Es wurden 13 Banden aus den vier Subtraktionsprodukten DP-2 isoliert, die Fragmente aufgereinigt, in *E. coli* kloniert und anschließend sequenziert.



**Abb. 38** Subtraktion von Einfachen Fraktionen der Zelllinie PT1590. **(A)** Je 4 µl der Produkte DP-1 und DP-2 wurden in einem Agarosegel aufgetrennt, die markierten Banden 1-12 extrahiert und sequenziert (M: Längenstandard) **(B)** AC-Fragment aus Mitochondrien-DNA (Chr. M), mit dem das CC-Fragment aus Bande 7 (hellgrau unterlegt) bis auf eine Base in seiner Mse I-Schnittstelle übereinstimmt (Pfeilspitze). Dunkelgrau: Differenzierungsbasen, unterstrichen: Mse I-Schnittstellen

Einen Überblick über die Sequenzierungsdaten aus den Subtraktionen der Zelllinie PT1590 gibt Tab. 37. Von 13 angereicherten Fragmenten waren sechs humanen (grau unterlegt) und sieben bakteriellen Ursprungs. Die Anteil von 54% bakteriellen und 46% humanen Sequenzen sowie die

<sup>38</sup> Subtraktion nach Felske, 1. SH: 400 ng Tester, J21, 30 µg Driver, 2. SH: 200 ng Tester, R21, 40 µg Driver

Häufigkeit von Fragmenten aus Wiederholungssequenzen (67% der humanen Sequenzen) ähnelte der bereits in Tab. 35 beschriebenen Verteilung.

**Tab. 37** Analyse der Sequenzierungsdaten aus den Subtraktionen der Zelllinie PT1590

Bande	Fraktion	Organismus (Gen) bzw. humanes Chromosom	Repeat/Familie/Klasse	Bemerkung*, **
2	AA	nicht eindeutig zuzuordnen	L1PA5, L1, LINE	über 95% Übereinstimmung mit vielen Regionen
4	AA	Chr. 10: 98357451 - 98357605	MLT1H2, MaLR, LTR	
7	CC	Chr. M: (-) 3300 - 3596		Pos. 2 : G→A generiert Mse I-Schnittstelle; (evt. differentiell)
11	GG	Chr. 2: (-) 128949175 - 128949374		keine Angabe zu Gen o. ä.
12	GG	Chr. 11: 78984169 - 78984289 bzw. Chr1: 85423114 – 85423153	AluJo, Alu, SINE bzw. AluJb, Alu, SINE	<b>differentielles Fragment</b>
13	GG	Chr. 1:(+) 172711375 - 172711519	FRAM, Alu, SINE	
1	AA	<i>E. coli</i> K12 MG1655		
3	AA	<i>E. coli</i> K12 MG1655		
5	TT	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (L-Asparagin-Transporter)		
6	TT	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (Histidinkinase)		
8	CC	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (vorhergesagtes Membranprotein)		
9	CC	<i>E. coli</i> DEC15a (Tryptophan-Synthase Untereinheit B)		
10	CC	<i>E. coli</i> K12 MG1655 (vorhergesagter Cyanat-Transporter)		

\*: Differenzierungsbasen stimmen mit der Fraktion überein, wenn keine Angabe

\*\*: Position (Pos.) ab Mse I-Schnittstelle

Alle Sequenzen wiesen die Differenzierungsbasen der jeweils verwendeten Fraktionen auf. Bis auf das Fragment aus Bande 2 konnten alle eindeutig identifiziert werden, da sie über 98% Übereinstimmung mit nur einer chromosomalen Region aufwiesen. Die Sequenz aus Bande 2 stammte von einem L1-Element und zeigte über 95% Übereinstimmung mit zahlreichen Regionen im Genom. Von einem humanen Fragment (Bande 11), das keine Wiederholungssequenz beinhaltete, konnte nur der chromosomale Ursprung festgestellt, aber keine zusätzliche Information über die Sequenz gewonnen werden.

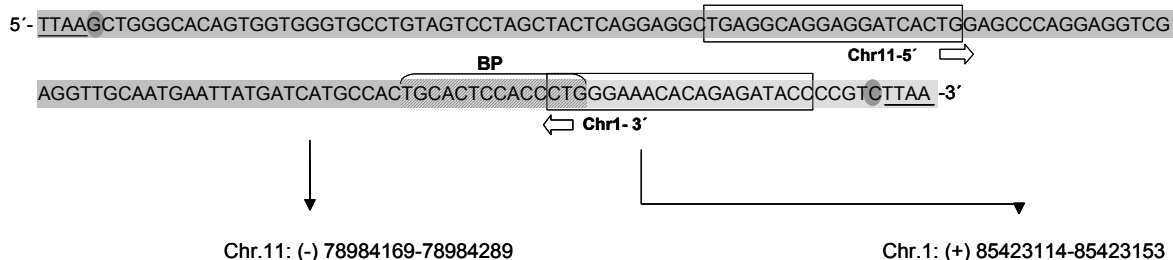
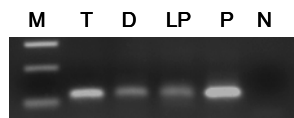
Das CC-Fragment, das in Bande 7 angereichert vorlag und ohne Adaptersequenzen 296 bp lang war, war mit hoher Wahrscheinlichkeit durch ein PCR-Artefakt zu einem CC-Fragment geworden (Abb. 38B). Seine Sequenz stimmte bis auf eine Base mit einem 490 bp langen AC-Fragment aus mitochondrialer DNA (Chr. M) überein. An dieser Stelle fand sich statt eines Guanins ein Adenin, wodurch eine Mse I-Schnittstelle und somit ein neues Mse I-Fragment mit den Differenzierungsbasen

CC generiert wurde, das höchst wahrscheinlich ein differentielles Fragment zwischen Tester und Driver darstellte. Aufgrund seiner wenig abwechslungsreichen Sequenz konnten jedoch keine spezifischen PCR-Primer angefertigt werden, mit deren Hilfe dies eindeutig belegt werden konnte.

Bande 12 aus DP-2 GG enthielt ein Fragment, dessen vorderer Teil von 126 bp zu 100% mit einem Abschnitt von Chromosom 11 und dessen hinterer Teil von 40 bp zu 100% mit einer Region von Chromosom 1 übereinstimmten. In der Mitte des Fragments gab es 14 bp, die beiden Sequenzen entsprachen (Abb. 39A). Die Region von Chromosom 11 konnte einem AluJo-Element und die Region von Chromosom 1 einem AluJb-Element der Familie der *Alu*-Wiederholungssequenzen zugeordnet werden. Da es sich um *Alu*-Elemente handelte, gab es zusätzliche Übereinstimmungen mit anderen chromosomalen Regionen, wobei eine wechselnde Anzahl von Basenpaaren und eine unterschiedliche Übereinstimmungsrate (alle <96%) zu verzeichnen waren. Um zu testen, ob es sich um ein Translokationsfragment der Zelllinie PT1590 handeln könnte, wurde eine spezifische Kontroll-PCR mit Primern durchgeführt, die in den betroffenen Abschnitten auf Chromosom 11 (Chr11-5') und Chromosom 1 (Chr1-3') banden. Die Primer wurden in diejenigen Abschnitte der Sequenzen gelegt, die die geringste Übereinstimmung für andere Regionen aufwiesen (ermittelt mit *NCBI Blast Search*). Es wurden die GG-Fraktionen aus Tester (T) und Driver (D) und ein Normalzellpool (LP) als Proben in die spezifische Kontroll-PCR eingesetzt (Abb. 39B). Als Positivkontrolle diente eine 1:100 Verdünnung des DP-1 GG der Subtraktion. Alle vier Proben generierten PCR-Produkte der erwarteten Länge von 93 bp, wobei die Banden der Proben T und P deutlich und die Banden der Proben D und LP schwächer und unscharf ausfielen. Da angenommen wurde, dass es aufgrund ihrer Spezifität für *Alu*-Elemente zu verschiedenen PCR-Produkten durch die Primer kommen konnte, wurden die spezifischen PCR-Produkte extrahiert und sequenziert. Die Sequenzen aus den Proben T und P waren identisch und gut editierbar. Im Gegensatz dazu waren die Sequenzen der Proben D und LP Mischsequenzen, die weniger gut lesbar waren. Sie wiesen an den gleichen Positionen insgesamt zwölf Abweichungen von der erwarteten Sequenz auf (Abb. 39C, fett kursiv gedruckt). Es wurde ein Vergleich der Sequenzen T/P bzw. D/LP mit der Datenbank USCS *Human Genome Bioinformatics/Blat Search* durchgeführt und die jeweils ersten zehn Treffer in Abb. 39C aufgelistet. Es zeigte sich, dass die Sequenz T/P zu 100% mit dem erwarteten Produkt übereinstimmte und in keinen anderen Regionen des Genoms Treffer mit relevanten Übereinstimmungsraten erzielte. Die Sequenz D/LP konnte keiner chromosomalen Region eindeutig zugeordnet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ließ sich vermuten, dass Bande 12 tatsächlich ein differentielles Fragment mit Translokationsbruchpunkt beinhaltete, das nur in der Tumorzelllinie PT1590, nicht aber in den Normalzellen des Patienten vorgelegen hatte.

**A Sequenzierung**

Bande 12 aus DP-2 GG

**B Kontroll-PCR****C Sequenzierung PCR-Produkte****T/P:**

TGAGGCAGGAGGATCACTGGAGCCCAGGAGGTCGAGGTTGCAATGAATTATGATCATGCCACTGC  
ACTCCACCCTGGGAAACACAGAGATACC

SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
71	1	71	93	100.0%	11	-	78984169	78984239	71
67	3	83	93	91.4%	14	+	66715758	66715838	81
66	1	86	93	88.4%	1	+	7042167	7042252	86
64	1	88	93	84.6%	1	+	2283431	2283516	86
63	1	76	93	92.2%	1	-	14881413	14881623	211
62	1	88	93	82.0%	11	+	47177958	47178042	85
61	1	88	93	81.4%	12	-	123562453	123562538	86
61	7	83	93	89.7%	11	+	33971078	33971154	77
61	1	83	93	86.8%	1	+	223645697	223645779	83
60	1	86	93	84.9%	20	-	30922773	30922858	86

**D/LP:**

TGAGGTGGGAGGAT**TGCT**TGAGCCCAGGAGGT**TGAGGTTGCA****GTGAGCTAAGAT****TGTGCCACTGC**  
ACTCCAGCCTGGGAAACACAGAGATACC

SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
75	1	88	93	95.3%	10	+	98958397	98958963	567
74	1	83	93	95.2%	Y	+	1647812	1830683	182872
74	1	83	93	95.2%	X	+	1647812	1830683	182872
73	1	86	93	93.0%	4	-	56472076	56472298	223
73	1	83	93	94.0%	3	-	56814338	56814420	83
72	6	93	93	89.3%	8	+	9109199	9109284	86
72	1	78	93	96.2%	19	+	15572697	15572774	78
71	1	83	93	92.8%	1	+	54599251	54599333	83
70	1	88	93	87.4%	6	+	68627934	68628020	87
70	1	75	93	97.4%	11	+	73858842	73858920	79

**Abb. 39** Analyse eines Fragments mit mutmaßlichem Translokationsbruchpunkt. **(A)** Die Sequenz der Bande 12 aus DP-2 GG stimmt zum Teil mit Chromosom 11 (mittelgrau) bzw. Chromosom 1 (hellgrau) überein (siehe Tab. 37). Der mutmaßliche Bruchpunkt (BP) liegt im schraffierten Bereich, in dem die Sequenz mit beiden Chromosomen übereinstimmt. Dunkelgrau: Differenzierungsbasen, unterstrichen: Mse I-Schnittstellen, umrandet: PCR-Primer **(B)** Kontroll-PCR mit den Primern Chr11-5' und Chr1-3' auf den GG-Tester (T) und GG-Driver (D) der Subtraktion und die Probe LP (Pool aus Normalzellen). Die Positivkontrolle P war DP-1 der Subtraktion (M: Längenstandard, N: Negativkontrolle). **(C)** Datenbankrecherche nach Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte: Die Sequenzen der Proben T und P bzw. D und LP waren identisch. Fett kursiv gedruckt: Abweichungen von dem erwarteten Produkt

### **3.5 Anhang zum Ergebnisteil: Fraktionierung durch fraktionsspezifische Primer**

Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, die Fraktionen durch Fraktionierungsprimer über die Sequenz Lib1 anzureichern, die alle Fragmente in einer Mse I-Repräsentation als Adaptersequenz trugen und die daher eine ubiquitäre Primerbindestelle zur Amplifikation darstellte. Die Spezifität eines Primers für eine Fraktion wurde durch die Erkennung einer der vier Differenzierungsbasen festgelegt, weshalb für die Einfachen Fraktionen je einer von vier Primern und für die Gemischten Fraktionen eine Kombination von zwei Primern eingesetzt wurde. Die PCR-Bedingungen des Fraktionierungsprotokolls wurden besonders stringent gehalten, um die Elongation des Synthesestrangs durch die Polymerase so weit zu restringieren, dass ein Fragment nur bei korrekter Basenpaarung an der Differenzierungsbase verlängert wurde. Zwar konnte eine zufrieden stellende Trennung der Fraktionen aus der Gesamtheit einer Mse I-Repräsentation über spezifische Fraktionierungsprimer nur teilweise erreicht werden, die Erkenntnisse aus diesen Versuchen wurden jedoch für die Fraktionierung über fraktionsspezifische Adapter genutzt und sollen daher hier vorgestellt werden.

Der einfachste Weg zur Trennung der Fraktionen mittels spezifischer PCR-Primer schien die Verwendung der LibN-Primer. Es handelte sich um Oligonukleotide mit einer Länge von 20 bp, die sich von Position 6 der Lib1-Sequenz bis über die Mse I-Schnittstelle erstreckten und mit der Differenzierungsbase abschlossen (LibA, LibT, LibC, LibG). Ihre Spezifität beruhte somit auf der Affinität der letzten 3'-Base an einer Differenzierungsbase. Im Zuge der Etablierung wurden verschiedene Modifikationen der LibN-Primer zur Erhöhung ihrer Selektionseigenschaften getestet: Erstens eine Verkürzung ausgehend vom 5'-Ende (3.5.2) und zweitens das gezielte Einfügen von nicht komplementären Basen (3.5.2). Beide Modifikationen sollten eine Destabilisierung der Primerbindung an die Zielsequenz erwirken, wodurch die korrekte Basenpaarung an der Differenzierungsbase für die Primerbindung an Bedeutung gewinnen sollte.

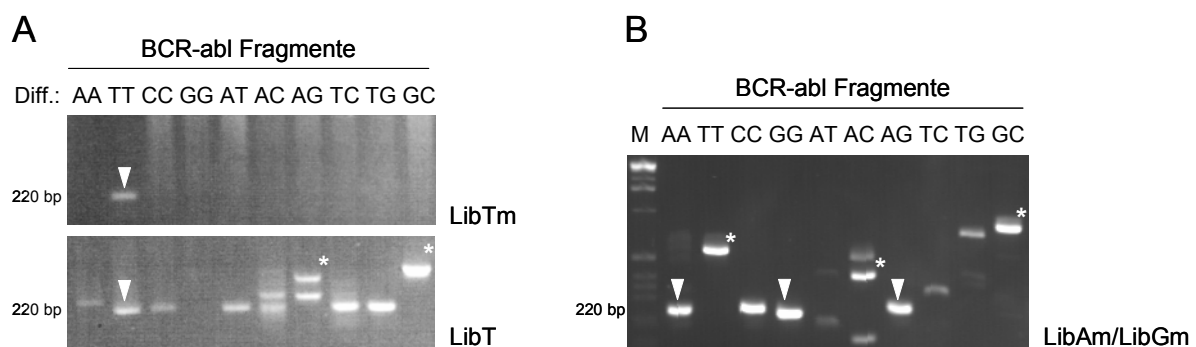
#### **3.5.1 Verkürzte Fraktionierungsprimer**

Basierend auf der Vorarbeit von D. Biener wurde die Fraktionierung mittels verkürzter Fraktionierungsprimer weiterentwickelt (Biener 2000). Eine Verkürzung der komplementären Basen zwischen einem PCR-Primer und seiner Zielsequenz führt bei gleich bleibender Annealing-Temperatur zur Destabilisierung der Bindung. Diese Destabilisierung wurde genutzt, um die Amplifikation von unerwünschten Fragmenten zu unterbinden. Die 20 Nukleotide umfassenden Primersequenzen LibA, LibT, LibC und LibG wurden vom 5'-Ende ausgehend um bis zu fünf Basen verkürzt. Die Länge eines Primers ging als Ziffer in seine Bezeichnung ein, ebenso wie die Nukleobase mit der dieser endete, z. B. 15LibT. Repräsentative Ergebnisse aus Experimenten mit verkürzten Fraktionierungsprimern werden in 3.5.3.2 und 3.5.3.3 dargestellt.

### 3.5.2 Mismatch-Fraktionierungsprimer

Ein weiterer Ansatz, der zur selektiven Anreicherung einer Fraktion mit Hilfe von fraktionsspezifischen Primern verfolgt wurde, war der Austausch einiger Basen in der Mitte der Primersequenz. Dadurch kam es bei ihrer Anlagerung an die Lib1-Bindestelle zu einer Fehlpaarung (mismatch), die zu Destabilisierung der Primerbindung führte.

Durch einen Austausch von einer bis drei Basen an verschiedenen Positionen der LibN-Primer (N = A, T, C, G) wurden mismatch-Primer (LibNm, m = mismatch) mit Schmelztemperaturen von ca. 56°C konstruiert. Es sollte ermittelt werden, welche LibNm-Primer in einer PCR präferentiell Fragmente mit den erwünschten Differenzierungsbasen amplifizieren. Zu diesem Zweck wurde ein Mse I-Fragment von 220 bp Länge isoliert, mit Lib1-Adaptoren versehen und in seinen Differenzierungsbasen verändert. Auf diese Weise entstanden zehn Fragmente, die alle eine andere Kombination von Differenzierungsbasen trugen (BCR-ABL Fragmente). Sie wurden mit den LibNm-Primern amplifiziert<sup>39</sup> und die Produkte in einem Agarosegel aufgetrennt.



**Abb. 40** Amplifikation von 220 bp großen Mse I-Fragmenten mit unterschiedlichen Differenzierungsbasen (Diff.) durch **(A)** die Fraktionierungsprimer LibTm bzw. LibT und **(B)** die Kombination aus LibAm mit LibGm (Pfeile: erwünschte spezifische Amplifikation, \*: Konkatomere)

In Abb. 40A sind die Produkte aus Amplifikationsreaktionen der BCR-ABL Fragmente mit LibTm und LibT dargestellt. Der Primer LibTm generierte nur aus dem Fragment mit den Differenzierungsbasen TT eine auf einem Agarosegel sichtbare Bande, während die Vergleichssequenz LibT auch andere Fragmente – zum Teil unter Bildung von Konkatomeren (verkettete Fragmente, sichtbar als Banden mit anderen Laufstrecken, gekennzeichnet mit \*) – anreichte. Die Selektionseigenschaften verschiedener LibNm und LibN Primer zeigt Tab. 38. Die Bandenstärke der angereicherten BCR-ABL Fragmente wurde mit +++ (stark), ++ (mittel), + (gering) und – (fehlende Bande) sowohl in Bezug auf die spezifische Amplifikation (gewünschte

<sup>39</sup> BCR-ABL Fragmente wurden auf ca. 90 pg/μl verdünnt und in einer spezifische Kontroll-PCR mit dem Primerpaar K562 bei 50 Zyklen und 60°C Annealing-Temperatur amplifiziert, das PCR-Produkt auf einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt

Differenzierungsbasen) als auch die unspezifische Amplifikation (andere Differenzierungsbasen) bewertet. Lib1 diene als Referenz, da dieser Primer die Differenzierungsbase nicht berücksichtigt und somit alle Fragmente gleichermaßen anreichte (spezifisch +++/unspezifisch +++). Der verkürzte Primer 15LibG leistete unter diesen Bedingungen auf Grund seiner geringen Schmelztemperatur (44°C) keine Anreicherung (-/-). Die beste Unterscheidung zwischen erwünschten und unerwünschten BCR-ABL Fragmenten trafen die Primer LibTm (+/-), LibCm (+++/+), LibGm (++/-) und LibGm2 (+/-) sowie die Kombination aus LibGm und LibCm (+/-).

Durch die Kombination von zwei Primern, wie sie für die Fraktionierung der Gemischten Fraktionen benötigt wird, stieg die Gefahr einer unspezifischen Anreicherung in Form von Konkatameren der isolierten Fragmente. Die Selektionseigenschaften einer bestimmten Kombination von Oligonukleotiden konnten anhand der Amplifikation isoliert vorliegender BCR-ABL Fragmente nicht beurteilt werden, da stets eine Vielzahl von unspezifisch amplifizierten Banden verschiedener Größe auftraten (Abb. 40B). Welche mismatch-Primer sich für die Gemischte Fraktionierung eignen, wurde deshalb empirisch ermittelt (s. u.).

Im folgenden Abschnitt werden repräsentative Ergebnisse für die Fraktionierung mittels mismatch-Fraktionierungsprimer gezeigt.

**Tab. 38** Amplifikation von 220 bp großen Mse I-Fragmenten mit fraktionsspezifischen Primern

Fraktion	Primer*	Spezifische Amplifikation	Unspezifische Amplifikation	Sequenz 5'→3'
	Lib1	+++	+++	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT
AA	LibA	n. d.	n. d.	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AA
	LibAm	+	++	GAT TCC TGC TGA <b>G</b> AG TTA AA
	LibAm2	n. d.	n. d.	GAT TCC T <b>CG</b> TGT CAG TTA AA
	LibAm3	n. d.	n. d.	GAT TCC TGC TGT <b>G</b> AG TTA AA
TT	LibT	+	++	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AT
	LibTm	+	-	GAT TCC TGC TGA <b>G</b> AG TTA AT
	LibTm2	++	++	GAT TCC TGC TGA <b>A</b> CAG TTA AT
	LibTm3	+	++	GAT TCC TGC T <b>TA</b> CAG TTA AT
CC	LibC	n. d.	n. d.	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AC
	LibCm	+++	+	GAT TCC TGC TGA <b>G</b> AG TTA AC
GG	15LibG	-	-	CTG CTG TCA GTT AAG
	17LibG	++	++	TCC TGC TGT CAG TTA AG
	LibG	++	++	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AG
	LibGm	++	-	GAT TCC TGC TGA <b>G</b> AG TTA AG
	LibGm2	+	-	GAT TCC TGC TGA <b>G</b> <b>T</b> G TTA AG
	LibGm3	n. d.	n. d.	GAT TCC TGC TGT <b>ACC</b> TTA AG
AT	LibAm/LibTm2	++	+	
AC	LibAm/LibCm	-	-	
AG	LibAm/LibGm	+	++	
TC	LibTm/LibCm	-	-	
	LibTm2/LibCm	+	++	
TG	LibTm/LibGm	+++	++	
	LibTm2/LibGm	+++	+	
GC	LibGm/LibCm	+	-	

n. d.: nicht dokumentiert; \*: Primer tragen fortlaufende Nummern hinter dem Namen

**fett kursiv**: mismatch-Basen



### 3.5.3 Einfache Fraktionen

Die PCR-Bedingungen der Fraktionierungs-PCR mussten stringent gestaltet werden, so dass es trotz Annealing eines Primers an ein unerwünschtes Fragment nicht zu dessen Elongation kommen konnte. Stringente PCR-Bedingungen wurden durch niedrige Konzentrationen von DNA-Matrize (engl.: *template*) und Reagenzien erreicht, sowie durch eine geringe Anzahl von Zyklen bei relativ hohen Annealing-Temperaturen. Verdünnungsschritte der PCR-Produkte zwischen den einzelnen Reaktionen sollten unerwünschte Fragmente aus den Probenansätzen abreichern und so den proportionalen Anteil erwünschter Fragmente nach einer weiteren PCR erhöhen. Im Folgenden wird dargestellt, wie sich diese Parameter auf die Fraktionierung mittels spezifischer Primer auswirkten. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurden diejenigen PCR-Bedingungen entwickelt, die eine Anreicherung von gewünschten Fragmenten und eine Abreicherung von unerwünschten Fragmenten gleichermaßen begünstigten.

#### 3.5.3.1 Einfluss der Primersequenz und der Templatekonzentration

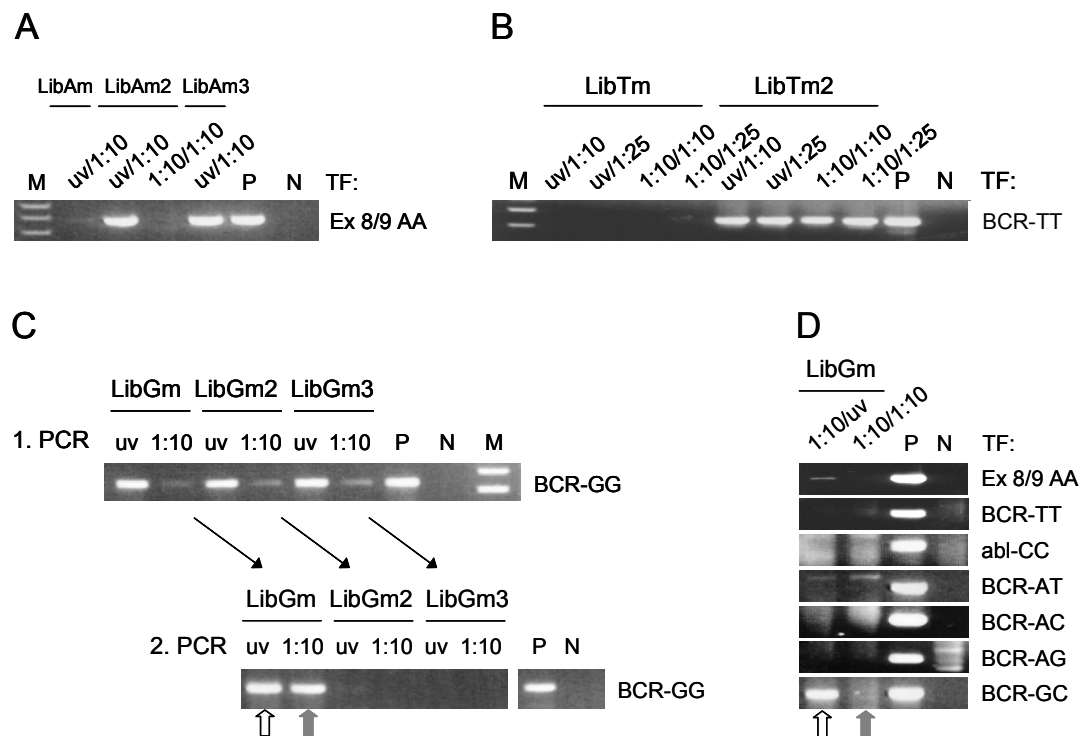
Es sollte ermittelt werden, wie sich die Destabilisierung der Primerbindung durch das Einfügen von mismatch-Basen an verschiedenen Positionen der Fraktionierungsprimer in Abhängigkeit von der Konzentration der DNA-Matrize (*template*) auf die Einfache Fraktionierung auswirkt. Zu diesem Zweck wurden AA-, TT- und GG-Fraktionen in zwei aufeinander folgenden PCR hergestellt, in denen die Konzentration der DNA-Matrize durch verschiedene Verdünnungsschritte des Ausgangsmaterials (z. B. 1:10) unter Beibehaltung des Probenvolumens variiert wurde<sup>40,41,42</sup>. Es wurden mismatch-Primer eingesetzt, die sich sowohl in der Anzahl ihrer mismatch-Basen als auch deren Position (gezählt vom 5'-Ende der Sequenz) in den 20 Basen umfassenden Sequenzen unterschieden.

---

<sup>40</sup> 1. PCR: Probe unverdünnt bzw. 1:10, Mix 1, T<sub>anneal</sub> 59°C, 25 Zyklen; 2. PCR: Probe 1:10, Mix 1, T<sub>anneal</sub> 59°C, 15 Zyklen; Primer je LibAm, LibAm2, LibAm3

<sup>41</sup> 1. PCR: Probe unverdünnt bzw. 1:10, Mix 3, T<sub>anneal</sub> 56°C, 25 Zyklen, 2. PCR: Probe 1:10 und 1:25, Mix 1, T<sub>anneal</sub> 56°C, 15 Zyklen, Primer je LibTm, LibTm2

<sup>42</sup> 1. PCR: T<sub>anneal</sub> 60°C, 25 Zyklen, Mix 2, Probe unverdünnt und 1:10; 2. PCR: T<sub>anneal</sub> 60°C, 25 Zyklen, Mix 2, 1. PCR unverdünnt und 1:10; Primer je LibGm, LibGm2, LibGm3



**Abb. 41** Einfluss von Verdünnungsschritten der DNA-Matrize vor der 1. und 2. Fraktionierungs-PCR (1./2. PCR) auf die Positivität und Reinheit von Einfachen Fraktionen in Abhängigkeit des mismatch-Fraktionierungsprimers. **(A)** Positivität von AA-Fraktionen (hergestellt mit LibAm, LibAm2 und LibAm3) nach der 2. PCR **(B)** Positivität von TT-Fraktionen (hergestellt mit LibTm und LibTm2) nach der 2. PCR **(C)** Positivität von GG-Fraktionen (hergestellt mit LibGm, LibGm2 und LibGm3) in der 1. und 2. PCR **(D)** Nachweis fraktionsfremder Fragmente in GG-Fraktionen (Pfeile markieren Fraktionen aus C; TF: Testfragment, uv: unverdünnt, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

Die Fraktionierungsprimer LibAm, LibTm und LibGm waren im Vergleich zur Lib1-Sequenz auf den Positionen 12 (T→A) und 13 (C→G) verändert worden. Bei AA- und TT-Fraktionierungen konnten mit ihnen keine positiven Fraktionen angereichert werden (Abb. 41A/B), wohingegen durch den Austausch nur einer Base auf Position 13 (C→G) in den Primern LibAm3 bzw. LibTm2 unter identischen Fraktionierungsbedingungen positive AA- bzw. TT-Fraktionen angereicht werden konnten. Wurden zwei Basen näher zum 5'-Ende eines Primers ausgetauscht, wie es bei LibAm2 der Fall war (Position 8: G→C; Position 9: C→G), so konnte das Positivfragment Ex 8/9 AA ebenfalls in der resultierenden Fraktion nachgewiesen werden, obwohl dessen geschätzte optimale Annealing-Temperatur im Vergleich zu LibAm um zwei Grad Celsius niedriger lag.

In TT-Fraktionen, die mit LibTm bzw. LibTm2 hergestellt wurden, war der Einfluss zweier mismatch-Basen auf die Positivität der Fraktionen stärker, als die Konzentration an DNA-Matrize. Vier Fraktionen, für die das Ausgangsmaterial nicht (unverdünnt; uv) bzw. im Verhältnis 1:10 und das Produkt der 1. PCR im Verhältnis 1:10 bzw. 1:25 verdünnt wurde, waren positiv für das Testfragment BCR-TT (Abb. 41B).

Der Nachweis des Testfragments BCR-GG zeigte nach der 1. PCR keinen Unterschied zwischen GG-Fraktionen, die mit den Primern LibGm, LibGm2 (Pos. 12: T→A; 13: C→G; 14: A→T;) und LibGm3

(Pos. 13: C→A; 14: A→C; 15: G→C;) hergestellt worden waren. Nach der 2. PCR waren unter den gewählten Bedingungen jedoch nur die Fraktionen des Primers LibGm weiterhin BCR-GG positiv (Abb. 41C). Ein Ausleseverfahren fraktionsfremder Fragmente in diesen Fraktionen zeigte den günstigen Einfluss einer 1:10 Verdünnung der Probe vor der 2. PCR: in dieser GG-Fraktion konnte keines der getesteten Fragmente nachgewiesen werden (Abb. 41D, grauer Pfeil).

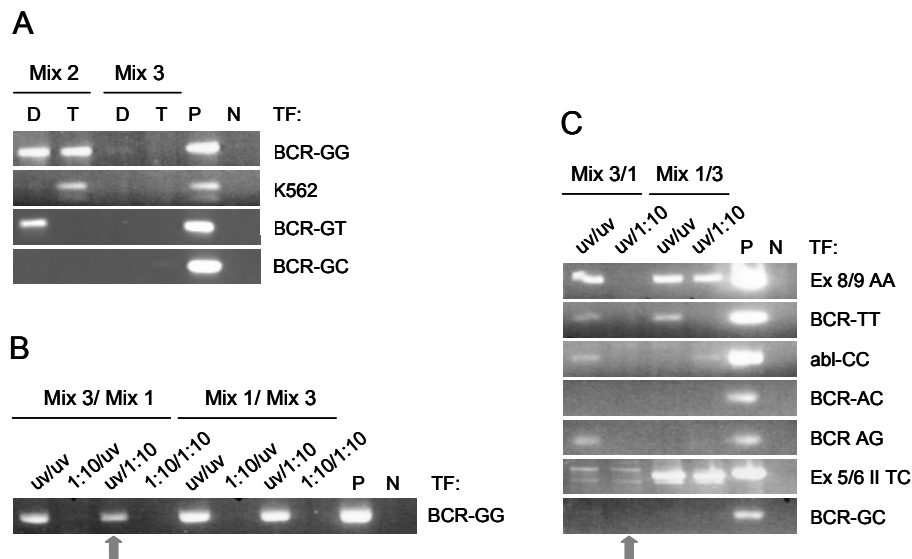
### 3.5.3.2 Einfluss von dNTP- und Primermenge

Die Effizienz einer PCR kann durch die Menge an verfügbaren dNTPs und Oligonukleotidprimern beeinflusst werden. Gezieltes Herabsetzen eines oder beider Reagenzien führt zu einer geringeren Ausbeute an Produkt, verringert aber auch die Wahrscheinlichkeit einer Elongation nach der Primerbindung an ein unerwünschtes Fragment.

Die Beziehung zwischen der Positivität bzw. Reinheit von GG-Fractionen und der Menge an dNTPs im Reaktionsansatz wurde untersucht. Dazu wurden je zwei GG-Fractionen mit den Reaktionsansätzen Mix 2 und 3 (2.4.2.1) und den Primern LibG/17G hergestellt<sup>43</sup> und mittels spezifischer Kontroll-PCR analysiert. Abb. 42A zeigt, dass eine Reduktion der dNTP-Menge von 100 µM in Mix 2 auf ein Viertel in Mix 3 (25 µM) die Anreicherung der Fragmente BCR-GG und BCR-ABL GG verhinderte. Diese waren in der Fraktionierung mit Mix 2 nachweisbar, ebenso wie das nicht der GG-Fraction zugehörige Fragment BCR-GT. Das Fragment BCR-GC wurde erfolgreich aus den Fraktionen abgetrennt (Abb. 42A). Des Weiteren wurden GG-Fractionierungen mit LibGm mit unterschiedlichen Konzentrationen des Templates, von dNTPs und Primern vorgenommen. Dazu wurden die 1. und die 2. Fraktionierungs-PCR je einmal mit Mix 1 und Mix 3 durchgeführt. Mix 3 war im Vergleich zu Mix 1 sowohl auf ein Viertel der dNTP- und die Hälfte der Primermenge verringert<sup>44</sup>. Keine der gewählten Bedingungen erzielte eine Anreicherung des Fragmentes BCR-GG aus einer 1:10 Verdünnung der Template-DNA, jedoch aus dem unverdünnten Template (uv; Abb. 42B). Eine 1:10 Verdünnung des 1. PCR-Produktes vor der 2. PCR wirkte sich günstig auf die Reinheit der Fraktionen aus: Es wurden weniger fraktionsfremde Fragmente nachgewiesen (Abb. 42C). Die Kombination aus Mix 1/Mix 3 (1. PCR/2. PCR) generierte mehr falsch-positive Banden als die aus Mix 3/Mix 1. Allein eine Kombination aus besonders stringenten Bedingungen (Mix 3/Mix 1; uv/1:10) erlaubte die Anreicherung einer reinen GG-Fraction. Aus diesen Ergebnissen wurden die PCR-Bedingungen für die reproduzierbar reine Fraktionierung der GG-Fraction mittels fraktionsspezifischer PCR-Primer abgeleitet (Tab. 39, s. u.). Alternativbedingungen für die Fraktionierung mit LibGm, die zu einem ebensolchen Ergebnis, sind Tab. 39 zu entnehmen.

<sup>43</sup> 1. PCR: 54°C, 25 Zyklen, Probe 1:50, Mix 3 bzw. Mix 2, Primer LibG; 2. PCR: 54°C, 15 Zyklen, Probe 1:25, Mix 3, Primer 17G

<sup>44</sup> 1. PCR: 25 Zyklen, Mix 3 vs. Mix 1, Probe unverdünnt und 1:10; 2. PCR: 15 Zyklen, Mix 1 bzw. Mix 3, Probe unverdünnt und 1:10; Primer je LibGm



**Abb. 42** Einfluss der dNTP- und Primermenge im PCR-Mix auf die Positivität und die Reinheit von GG-Fraktionen. **(A)** Fraktionierung mit LibG (1. PCR) und 17G (2. PCR). Testfragment (TF) K562 ist Positivfragment in Probe T („Testerpool“), nicht in D („Driverpool“) **(B)** Positivität der Fraktionierung mit LibGm (2. PCR) in Abhängigkeit von der Templateverdünnung **(C)** Nachweis von fraktionsfremden Fragmenten in BCR-GG-positiven Proben aus (B). (uv: unverdünnt, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle, Pfeile markieren positive und reine Fraktion).

### 3.5.3.3 Einfluss der Annealing-Temperatur

Es wurde empirisch ermittelt, welche Temperaturen für das Anlagern der Primer (Annealing-Temperatur,  $T_{\text{anneal}}$ ) in den Fraktionierungs-PCR geeignet sind, um die Fraktionen vollständig und rein anzureichern.

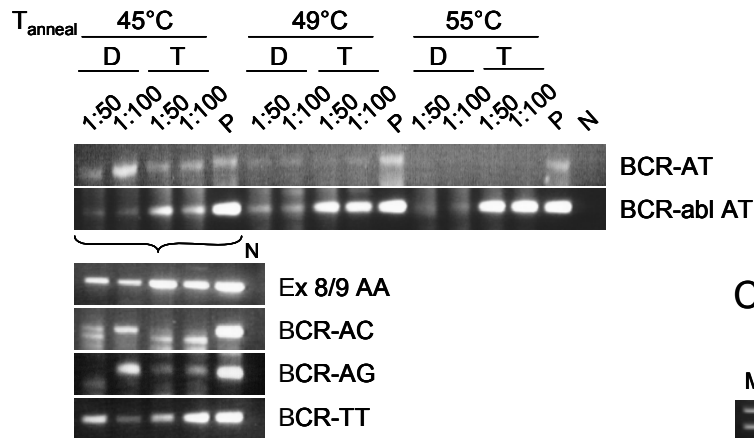
Drei AT-Fraktionierungen wurden mit den Primern 17A und 17T in jeweils drei aufeinander aufbauenden PCR bei entweder 45, 49 oder 55°C Annealing-Temperatur in einem Thermocycler (Robocycler® 96 Gradient, Stratagene) durchgeführt<sup>45</sup> und ihre Fragmentzusammensetzung mittels spezifischer Kontroll-PCR untersucht. Das Fragment BCR-AT wurde lediglich in den AT-Fraktionen eindeutig nachgewiesen, die bei einer Annealing-Temperatur von 45°C amplifiziert worden waren. Allerdings wurden in diesen Fraktionen ebenfalls Fragmente mit den Differenzierungsbasen AA, AC, AG und TT nachgewiesen (Abb. 43A). Um zu testen, ob eine Erhöhung der Annealing-Temperatur die Reinheit der Fraktionen begünstigt, ohne dass erwünschte Fragmente abgereichert werden, wurde ein vergleichbares Experiment mit längeren Primern in der 1. PCR (19A und 19T) bei Annealing-Temperaturen von 45, 48 und 52°C durchgeführt<sup>46</sup>. Abb. 43B zeigt den Nachweis von Testfragmenten in den resultierenden AT-Fraktionen. Unter diesen Bedingungen werden zwei AT-Fragmente (BCR-AT und BCR-ABL AT) nur bei einer Annealing-Temperatur von 48°C zufrieden stellend angereichert.

<sup>45</sup> 1. PCR: Probe 1:50 und 1:100, Mix 3, Primer dig-17A und 17T, Programm „1.FR-EF/GF“; 2. PCR: aufreinigen der 1. PCR über Anti-Digoxigenin-Partikel, Mix 3, Primer 17A und bio-17T, Programm „2.FR-EF/GF“; 3. PCR: aufreinigen der 2. PCR über Streptavidin-Partikel, Mix 1, Primer 17A und 17T, Programm „3.FR-EF/GF“

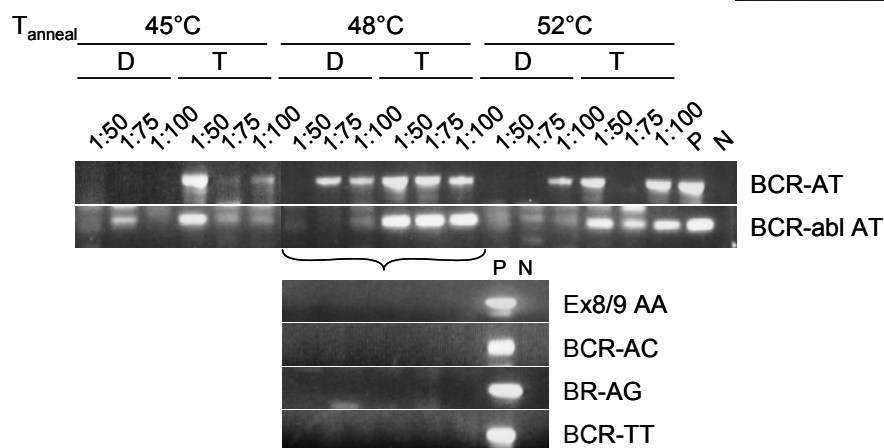
<sup>46</sup> 1. PCR: Proben 1:50, 1:75 und 1:100, Mix 3, Primer dig-19A und 19T, Programm „1.FR-EF/GF“; 2. PCR: Aufreinigen der 1. PCR über Anti-Digoxigenin-Partikel, Mix 3, Primer 17A und bio-17T, Programm „2.FR-EF/GF“; 3. PCR: aufreinigen der 2. PCR über Streptavidin-Partikel, Mix 1, Primer 17A und 17T, Programm „3.FR-EF/GF“

Die fraktionsfremden Fragmente Ex 8/9, BCR-AC, BCR-AG und BCR-TT konnten aus den Ansätzen bis unter die Nachweisgrenze abgereichert werden.

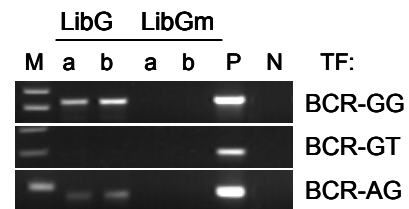
**A**



**B**



**C**



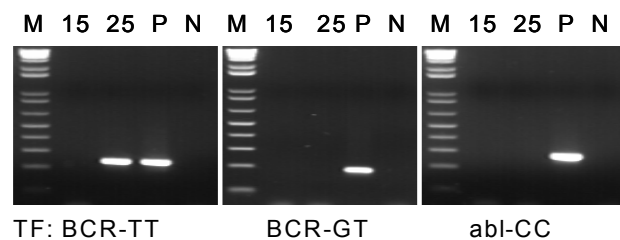
**Abb. 43** Einfluss der Annealing-Temperatur auf die Fraktionierung. **(A)** AT-Fraktionierung der Proben D („Driverpool“) und T („Testerpool“) bei 45, 49 und 55°C mit den Primern 17A und 17T (angegeben ist die Verdünnung des Ausgangsmaterials vor der 1. PCR) **(B)** AT-Fraktionierung bei 45, 48 und 52°C mit den Primern 19T und 19A (angegeben ist die Verdünnung vor der 1. PCR) **(C)** Einfluss einer Touchdown-PCR auf eine GG-Fraktionierung mit LibG bzw. LibGm (a: 1. PCR ohne Touchdown, b: 1. PCR mit Touchdown, M: Marker, TF: Testfragment, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

Um die Einfache Fraktionierung mit mismatch-Primern besonders stringent zu gestalten, wurde eine GG-Fraktionierung mit einer Touchdown-PCR zu Beginn der 1. PCR durchgeführt, bei der die Annealing-Temperatur anfangs 8°C über der angestrebten Schmelztemperatur für die Primer (60°C) lag und dann mit jedem Zyklus um 1°C bis auf 60°C abnahm. Abb. 43C zeigt einen Vergleich

zwischen GG-Fractionen ohne (a) und mit (b) Touchdown-PCR durch die Primer LibG bzw. LibGm<sup>47</sup>. Die Touchdown-PCR hatte keinen Einfluss auf die Reinheit der GG-Fractionen mit LibG. Die Fraktionierung mit LibGm war unter den gleichen Bedingungen falsch-negativ für das Fragment BCR-GG.

### 3.5.3.4 Einfluss der Anzahl von PCR-Zyklen

Die GG-Fraktion aus 3.5.3.3 gab einen Hinweis darauf, dass die Ausbeute von Positivfragmenten bei Benutzung der mismatch-Primer im Vergleich zu den LibN-Primern reduziert war. Es sollte untersucht werden, ob eine Erhöhung der Zyklenzahl die Anreicherung von Positivfragmenten verstärken kann, ohne zu Einbußen bei der Reinheit der Fraktion zu führen. Daher wurden TT-Fraktionierungen mit LibTm3 mit 15 bzw. 25 Zyklen in der 2. PCR vorgenommen<sup>48</sup>. Der Vergleich zeigt, dass sich das Fragment BCR-TT erst nach 25 Zyklen in der 2. PCR nachweisen lässt. Die Fragmente BCR-GT und abl-CC wurden in beiden Fällen erfolgreich abgetrennt (Abb. 44).



**Abb. 44** Einfluss der Zyklenzahl (15 bzw. 25) in der 2. Fraktionierungs-PCR mit LibTm3 auf den Nachweis von Testfragmenten (TF) in TT-Fractionen (M: Marker, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle).

<sup>47</sup> 1. PCR: Probe 1:10, Mix 1, Primer LibG bzw. LibGm. Touchdown-PCR: 1. Zyklus: 94°C 2 min, 68°C 30 s, 72°C 2 min; Zyklus 2-10: 94°C 40 s, 68°C 30 s -1°C/Zyklus, 72°C 90 s; anschließend „1. FR-EF“. Die Kontrolle wurde ohne Touchdown-PCR durchgeführt. 2. PCR: Probe 1:10, Mix 1 und Primer LibG zw. LibGm, Programm „2. FR-EF/GF“

<sup>48</sup> 1. PCR: Probe 1:10, Primer LibTm, Mix 1 vs. Mix 3, 25 Zyklen (Programm: 1. FR-EF) 2. PCR: Probe 1:10, LibTm, Mix 3. 15 Zyklen für die Probe mit Mix 1 in 1. PCR (Programm: 2. FR-EF/GF), 25 Zyklen für die Probe mit Mix 3 (Programm: 1. FR-EF/GF), T<sub>anneal</sub> je 56°C

### 3.5.4 Überblick und Reproduzierbarkeit (Einfache Fraktionen)

Einen Überblick über die Fraktionierungsbedingungen, die unter Verwendung von mismatch-Fraktionierungsprimern reproduzierbar zu reinen und positiven Einfachen Fraktionen führten, gibt Tab. 39.

**Tab. 39** PCR-Bedingungen zur Fraktionierung der EF mittels mismatch-Primern

<b>1. PCR</b>	<b>AA</b>	<b>TT</b>	<b>CC</b>	<b>GG</b>	
Templateverdünnung	1:10	1:10	1:10	1:10	uv
Mix	1	3	1	2	2
Primer	LibAm2	LibTm3	LibCm	LibGm	LibGm
Zyklen	25	25	25	25	25
T <sub>anneal</sub>	59°C	56°C	60°C	60°C	54°C
PCR-Maschine	MJ	MJ	MJ	MJ	Robocycler
<b>2. PCR</b>					
Templateverdünnung	1:10	1:10	1:10	1:10	1:50
Mix	1	2	3	2	3
Primer	LibAm2	LibTm3	LibCm	LibGm	LibGm
Zyklen	15	25	15	25	15
T <sub>anneal</sub>	59°C	56°C	60°C	60°C	54°C
Thermocycler	MJ	MJ	MJ	MJ	Robocycler

### 3.5.5 Gemischte Fraktionen

Zur Anreicherung von Gemischten Fraktionen wurden zwei Fraktionierungsprimer benötigt, da ihre Fragmente zwei verschiedene Differenzierungsbasen trugen. Neben der gewünschten Fraktion wurden bei diesem Vorgehen auch zwei Einfache Fraktionen exponentiell amplifiziert, die die entsprechenden Differenzierungsbasen trugen. Daher wurden die Fragmente einer Gemischten Fraktion mit Hilfe einer Biotin- oder Digoxigenin-Markierung und deren Kopplung an paramagnetische Partikel in Abhängigkeit je einer Differenzierungsbase zweimal nacheinander positiv selektiert (2.10.1).

Eine Markierung von Fragmenten erfolgte durch ihre Amplifikation mit einem markierten und einem nicht markierten Oligonukleotidprimer in der 1. Fraktionierungs-PCR. In der „PCR-Produkt-Kopplung“ (2.10.1) wurde das Produkt der 1. Fraktionierungs-PCR mit paramagnetischen Partikeln inkubiert, diese immobilisiert und anschließend vom Überstand des Reaktionsansatzes getrennt. Die paramagnetischen Partikel wurden dann in die 2. Fraktionierungs-PCR eingesetzt und die an sie gebundenen Fragmente wiederum mit einem markierten und einem nicht markierten Oligonukleotidprimer amplifiziert. Hierbei wurde derjenige Oligonukleotidprimer markiert eingesetzt, der in der ersten PCR ohne Markierung verwendet worden war. Für die zweite Positivselektion wurde das PCR-Produkt wiederum mit paramagnetischen Partikeln inkubiert und der Überstand abgenommen. In einer 3. Fraktionierungs-PCR, die mit zwei nicht markierten Primern durchgeführt wurde, wurden die gewünschten Fragmente weiter angereichert.

Die erste Positivselektion wurde entweder mit biotinylierten Fraktionierungsprimern und Streptavidin beschichteten Partikeln (Dynabeads® M-280 Streptavidin, Dynal) oder mit digoxigenierten

Fraktionierungsprimern und Anti-Digoxigenin beschichteten Partikeln (Anti-Digoxigenin Magnetische Partikel, Roche) durchgeführt. Die zweite Positivselektion erfolgte dann mit dem jeweils anderen Selektionsverfahren. Sorgfältiges und wiederholtes Waschen der paramagnetischen Partikel nach der Bindung der markierten Fragmente sollte dafür sorgen, dass nicht gebundene Fragmente zuverlässig abgetrennt wurden (2.10).

Es wurde untersucht, ob sich das oben beschriebene Verfahren einer zweifachen Positivselektion zur Anreicherung von positiven und reinen Gemischten Fraktionen mittels fraktionsspezifischer PCR-Primer eignet. Zunächst wurden Fraktionierungen der Proben D (Driverpool) und T (Testerpool des BCR-ABL Testsystems) mit verkürzten Fraktionierungs-Primern nach dem von D. Biener erarbeiteten Protokoll vorgenommen<sup>49</sup>. Im Falle einer GA-Fraktion erfolgte die erste Selektion nach einer Markierung mittels biotinyliertem 17G (bio-17G) und die zweite mittels digoxigeniertem 17A (dig-17A). Die Anreicherung der erwünschten Fragmente BCR-AG und BCR-ABL AG (Positivfragment nur für Probe T) wurde auf diese Weise vollständig erreicht, fraktionsfremde Fragmente konnten jedoch nicht gänzlich abgetrennt werden (Abb. 45A). Da die Verwendung von mismatch-Primern einen großen Vorteil für die Reinheit der Einfachen Fraktionen erbrachte, wurde geprüft, ob sie zur Anreicherung der Gemischten Fraktionen ebenfalls geeignet waren. Dazu wurden GT-Fraktionen der Proben T und D mit bio-LibGm und LibTm2 (1. PCR) bzw. LibGm und dig-LibTm2 (2. PCR) hergestellt<sup>50</sup> und die Anreicherung von Positivfragmenten im Verlauf der drei Fraktionierungs-PCR mittels spezifischer Kontroll-PCR analysiert. Das Positivfragment BCR-GT wurde in jeder der drei Fraktionierungs-PCR nachgewiesen, schien aber nach der 2. PCR nicht mehr angereichert worden zu sein. Das Fragment BCR-ABL GT, das in Probe T aber nicht in Probe D ein Positivfragment darstellte, wurde in allen drei Reaktionen kontinuierlich angereichert (Abb. 45B).

Des Weiteren wurde untersucht, ob sich unerwünschte Fragmente durch die Positivselektionen gleichermaßen gut aus einer Gemischten Fraktion abtrennen ließen. Zu diesem Zweck wurden TA- und TG-Fraktionen der Proben T und D hergestellt<sup>51</sup> (1. PCR: dig-LibTm2, 2. PCR: bio-LibGm bzw. bio-LibAm) und analysiert. In der 1. PCR wurden die Reaktionsansätze Mix 1+ bzw. Mix 1, mit den Konzentrationen 0,8 µM bzw. 0,4 µM beider Primer, verwendet. In allen Fraktionen konnte ein Positivfragment nachgewiesen werden. In den TA-Fraktionen wurde von den getesteten Fragmenten jeweils BCR-TT nachgewiesen, unabhängig davon, aus welcher Probe die Fraktion stammte, oder welcher Reaktionsansatz verwendet wurde. TG-Fraktionen der Probe B enthielten keine

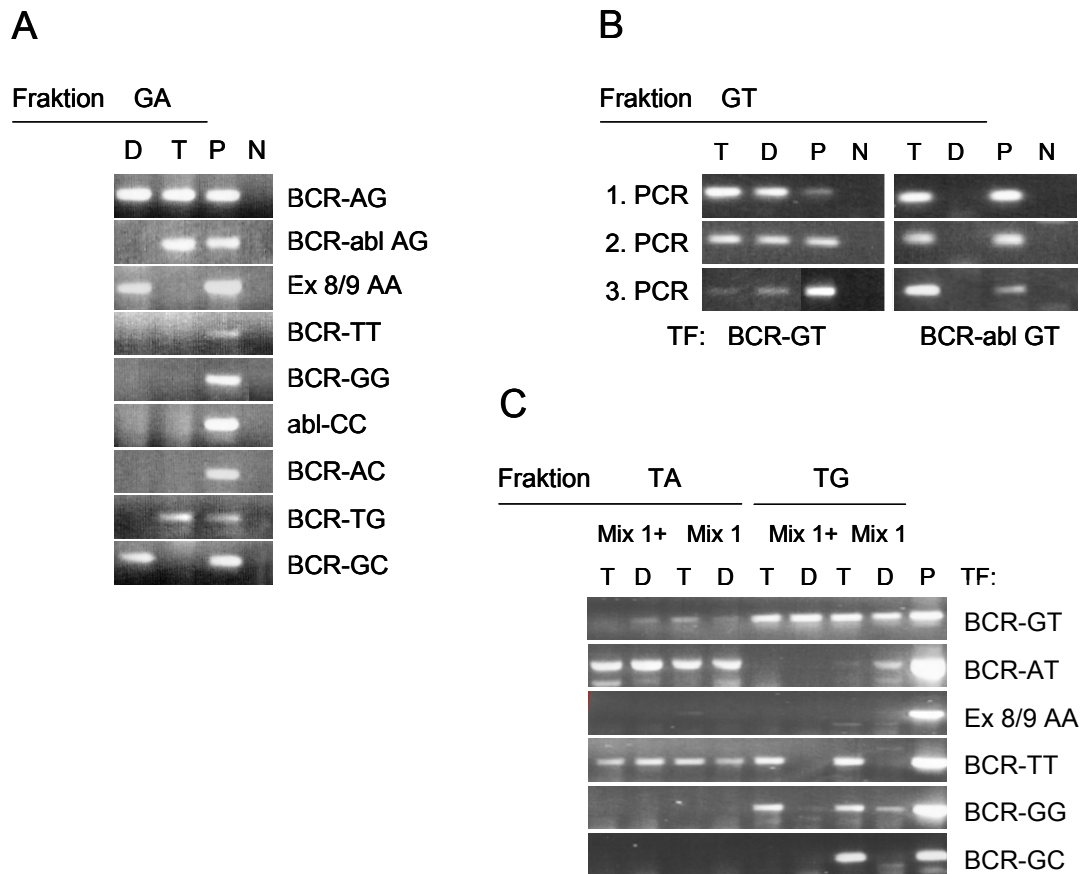
<sup>49</sup> 1. PCR: Proben 1:25, Mix 3, T<sub>anneal</sub> 54°C, 25 Zyklen, bio-17G, 17A, PCR-Produkt-Kopplung an Streptavidin-Partikel (Dynal); 2. PCR: Mix 3, T<sub>anneal</sub> 54°C, 15 Zyklen, 17G, dig-17A, PCR-Produkt-Kopplung an Anti-Digoxigenin-Partikel (Roche); 3. PCR: Mix 1, T<sub>anneal</sub> 54°C, 40 Zyklen, 17G, 17A

<sup>50</sup> 1. PCR: Proben unverdünnt Mix 3, T<sub>anneal</sub> 52°C, 25 Zyklen, bio-LibGm, LibTm2, PCR-Produkt-Kopplung an Streptavidin-Partikel (Dynal); 2. PCR: Mix 3, T<sub>anneal</sub> 52°C, 15 Zyklen, LibGm, dig-LibTm2, PCR-Produkt-Kopplung an Anti-Digoxigenin-Partikel (Roche); 3. PCR: Mix 1, T<sub>anneal</sub> 52°C, 40 Zyklen, LibGm, LibTm2

<sup>51</sup> 1. PCR: Proben unverdünnt, Mix 1 bzw. Mix1+, T<sub>anneal</sub> 52°C, 35 Zyklen, dig-LibTm2 + LibGm bzw. LibAm, PCR-Produkt-Kopplung an Anti-Digoxigenin-Partikel (Roche); 2. PCR: Mix 3, T<sub>anneal</sub> 52°C, 15 Zyklen, bio-LibGm bzw. bio-LibAm + LibTm2, PCR-Produkt-Kopplung an Streptavidin-Partikel (Dynal); 3. PCR: Mix 1, T<sub>anneal</sub> 52°C, 40 Zyklen, LibGm bzw. LibAm + LibTm2.



unerwünschten Testfragmente, wohingegen in TG-Fractionen der Probe A sowohl BCR-TT als auch BCR-GG und BCR-GC nachgewiesen wurden (Abb. 45C).



**Abb. 45** Zweifache Positivselektion von Gemischten Fraktionen. **(A)** GA-Fraktionierung der Proben T und D: erste Positivselektion mittels bio-17Gm, zweite Positivselektion mittels dig-17A **(B)** GT-Fraktionierung der Proben T und D: erste Positivselektion mittels bio-LibGm, zweite Positivselektion mittels dig-LibTm2 **(C)** TA- und TG-Fraktionierung der Proben T, D: erste Positivselektion mittels dig-LibTm2, zweite Positivselektion mittels bio-LibGm bzw. bio-LibAm (TF: Testfragment, P: Positivkontrolle, N: Negativkontrolle)

So wie hier kam es immer wieder zu falsch positiven Ereignissen in den Gemischten Fraktionen, vor allem durch einfache Fragmente, die die entsprechenden Differenzierungsbasen mit der Fraktion teilten. Es konnte kein Protokoll für fraktionsspezifische Primer etabliert werden, mit dessen Hilfe die Gemischten Fraktionen positiv und rein angereichert werden konnten. Daher wurde ein Protokoll zur Fraktionierung mittels fraktionsspezifischer Adapter etabliert (3.2).

## 4 Diskussion

### 4.1 *Eine Translokation als Ausgangspunkt einer Zielgerichteten Therapie*

Trotz guter Erfolge bei der Behandlung von Krebspatienten durch verbesserte Operationstechniken und adjuvante Therapien mit neuen Wirkstoffen versterben viele Patienten noch Jahre nach der Entfernung des Primärtumors an einer systemischen Krebserkrankung. Um der Bildung eines Lokalrezidivs oder von Fernmetastasen vorzubeugen bzw. klinisch manifeste Metastasen zu behandeln, wurde in den letzten Jahren an der Entwicklung von Medikamenten gearbeitet, die sich gegen molekulare Zielstrukturen auf Tumorzellen richten (engl. „*molecular targeted therapies*“). Detaillierte Kenntnisse über molekulare Mechanismen der Krebsentstehung können neue Zielstrukturen für Medikamente identifizieren, die im Idealfall trotz eines hohen Wirkungsgrades relativ geringe Nebenwirkungen haben.

Ein bekanntes Beispiel für eine solche Therapie ist die Behandlung von Leukämiepatienten mit dem Wirkstoff STI571, der unter dem Namen Imatinib (Handelsname Gleevec) im Jahr 2001 zugelassen wurde. Die Chronische Myeloische Leukämie (CML) ist eine der häufigsten hämatologischen Krebserkrankungen und durch die Translokation t(9;22) und das daraus resultierende Fusionsgen *BCR-ABL* gekennzeichnet. Das Onkoprotein Bcr-ABL transformiert myeloide Vorläuferzellen durch eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität, die über die Induktion verschiedener Signalkaskaden zur Suppression des Transkriptionsfaktors C/EBP $\alpha$  führt. C/EBP $\alpha$  aktiviert die Transkription von Genen, die in myeloischen Vorläuferzellen die Differenzierung zu Granulozyten auslösen (Perrotti, Cesi et al. 2002). Bei der CML kommt es zu einer übermäßigen Proliferation dieser Vorläuferzellen und in der Blastenkrise oft zum kompletten Verlust von reifen Granulozyten. Es konnte gezeigt werden, dass BCR-ABL zusätzlich den Translations-Initiierungskomplex eIF4F aktiviert, weshalb eine fehlregulierte Translation möglicherweise zur Pathogenese der CML beiträgt (Prabhu, Saadat et al. 2006). Imatinib blockiert die Tyrosinkinaseaktivität von Bcr-ABL durch eine kompetitive Inhibition seiner ATP-Bindestelle und führt somit zu einem Proliferationsstopp und einer Differenzierung der Tumorzellen. Die Überlebenschancen von CML-Patienten besonders in frühen Phasen der Erkrankung haben sich durch die Therapie mit Imatinib enorm verbessert (Frame 2006).

### 4.2 *Translokationen in epithelialen Tumoren*

Amplifikationen, wie beispielsweise die des HER2/neu-Gens beim Mammakarzinom, und Deletionen von genetischem Material aber auch strukturelle Aberrationen der Chromosomen sind häufige Mutationen in epithelialen Tumoren. Im Gegensatz zu diesen Aberrationen konnte die Bedeutung von Translokationen und ihren Fusionsgenen für die Genese bzw. Progression von Karzinomen bisher kaum geklärt werden.

Das Schilddrüsenkarzinom ähnelt durch die Aktivierung von transformierenden Fusionsgenen den Leukämien, Lymphomen und Sarkomen. Thyroidales Epithel zeigt nach einer Bestrahlung eine starke Anfälligkeit für chromosomale Veränderungen, die mit einer Aktivierung der NHEJ-Reparaturmaschinerie und einer erhöhten Resistenz gegen Apoptose einhergeht (Yang, Namba et al. 1997). Ebenso wie bei den hämatologischen Tumoren sind spezifische Subtypen der Schilddrüsenkarzinome mit wiederholt auftretenden Fusionsgenen assoziiert (Kroll, Sarraf et al. 2000; Tonon, Modi et al. 2003). Das Fusionsgen *MECT1-MAML2* führt beispielsweise durch eine konstitutive Aktivierung des Notch-Signalweges zur Ausbildung eines Mukoepidermoidkarzinoms der Schilddrüse (Tognon, Knezevich et al. 2002). Translokationen von Genen des Notch-Signalwegs wurden auch in humanen T-Zell Leukämien und Lymphomen beschrieben (Ellisen, Bird et al. 1991). Diese Parallelen könnten entweder bedeuten, dass Schilddrüsenkarzinome sich in ihrem Entstehungsmechanismus von anderen epithelialen Tumoren unterscheiden, oder aber dass Fusionsgenprodukte generell eine Rolle bei der Karzinogenese spielen können.

In einer Untersuchung über das Vorkommen von balancierten Translokationen in den neun häufigsten humanen Tumoren – darunter epitheliale und nicht-epitheliale – zeigten Mitelman, Johansson et al., dass ihre Anzahl eine direkte Funktion der Häufigkeit von aberranten Karyotypen in diesen Entitäten ist (Mitelman, Johansson et al. 2004). Obwohl die absolute Zahl der beobachteten Fälle differiert, scheint es keine fundamentalen Unterschiede zwischen den verschiedenen Gewebetypen zu geben. Der prozentuale Anteil von translozierten Genen einer Funktionsklasse ist ebenfalls vergleichbar: In allen untersuchten Entitäten sind Gene der Transkriptionskontrolle mit ca. 38 – 44% und Gene für Tyrosinkinasen mit ca. 5 – 7% betroffen. Diese Übereinstimmungen sprechen dafür, dass ähnliche molekulare Mechanismen wenigstens einigen epithelialen und nicht-epithelialen Tumoren gemein sind. Diese Annahme wird durch das Vorkommen von Fusionsgenen wie beispielsweise *ETV6-NTRK3*, in sowohl hämatologischen als auch mesenchymalen (congenitales mesoblastisches Nephrom, CMN) und epithelialen Tumoren (sekretorisches Mammakarzinom) gestützt (Eguchi, Eguchi-Ishimae et al. 1999; Tognon, Knezevich et al. 2002; Anderson, Gibson et al. 2006).

### **4.3 Nachweismethoden für Chromosomenaberrationen**

Die Frage, warum derartige Zusammenhänge bisher selten in epithelialen Tumoren beschrieben wurden, hängt sicherlich mit technischen Schwierigkeiten bei der Analyse ihrer komplex veränderten Karyotypen zusammen.

Die klassische Zytogenetik analysiert Chromosomenaberrationen mittels Bänderungstechniken, mit denen jedes Chromosom durch ein charakteristisches Bandenmuster erkennbar wird. So konnte 1973 gezeigt werden, dass das bei der CML vorkommende Philadelphiachromosom eine Translokation zwischen den Chromsomen 22 und 9 darstellte (Rowley 1973). Dies war die Grundlage für den ersten Nachweis eines translozierten Gens, der später mit Hilfe einer spezifischen Sonde gegen das

Kandidatengen *c-abl* auf einem Membran-Blot erbracht werden konnte (de Klein, van Kessel et al. 1982).

Mit der positionellen Klonierung wurde es 1986 möglich, auch unbekannte krankheitsassoziierte Gene zu identifizieren, die von strukturellen Aberrationen betroffen sind (Royer-Pokora, Kunkel et al. 1986). Beispielsweise gelang es Fountain et al. anhand von zwei Patienten mit Neurofibromatose vom Typ 1, die balancierte Translokationen zwischen den Chromosomen 17q11.2 und 22 bzw. 17q11.2 und 1 aufwiesen, das betroffene Gen *NFI* auf Chromosom 17 zu klonieren (Fountain, Wallace et al. 1989; Fountain, Wallace et al. 1989). Bei einer positionellen Klonierung der Bruchpunkte von Chromosomenaberrationen müssen die betroffenen Regionen zunächst in überlappenden Klonen (engl. *clon-contig*) z. B. aus bakteriellen artifiziellen Chromosomen (BACs) dargestellt werden. Durch eine Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten BACS auf betroffene Metaphasen kann der Bruchpunkt weiter eingegrenzt werden. Die Sequenz des identifizierten Klons wird dann auf bereits bekannte Gene oder offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) und diese Kandidatengene anschließend mittels Mutationsanalysen untersucht. Dieses Vorgehen ist aufwendig und für die Analyse von epithelialen Tumoren meist nicht geeignet, da sich in ihren oft aneuploiden Zellen strukturelle Veränderungen in hohem Maße überlagern können.

Die Verbesserung der zytogenetischen Analyse durch chromosomenspezifische FISH-Technologien wie dem *spectral karyotyping* (SKY) oder der *multiplex-fluorescence in situ hybridization* (m-FISH) erlaubt es, komplexe Chromosomenveränderungen aufzudecken, die mit konventionellen Techniken nicht detektierbar waren. So wurden durch SKY unter zahlreichen Aberrationen sieben wiederholt auftretende Translokationen in Plasmazytomen der Maus aufgedeckt, die wahrscheinlich zur Tumorgenese beitragen (Coleman, Schrock et al. 1997). Allerdings gibt es auch hier technische Limitationen bei der Analyse von Karzinomzellen. Zum einen lassen sich Metaphasen guter Qualität aufgrund von niedrigen Teilungsraten nur schwer aus soliden Tumoren anfertigen. Zum anderen unterliegen diese Methoden optischen Auflösungsgrenzen, die sehr kleine Veränderungen nicht darstellen können.

Durch einen neuen bioinformatischen Ansatz zeigten Tomlins, Mehra et al. im Jahr 2006, dass Genfusionen zwischen *TMPRSS2* und ETS-Transkriptionsfaktoren häufig in Prostatakarzinomen vorkommen. Sie analysierten Daten aus Genexpressions-Arrays von normalem und neoplastischem Prostatagewebe mit der so genannten *cancer outlier profile analysis* (COPA), mit deren Hilfe zunächst überexprimierte Kandidatenonkogene identifiziert wurden. In einem weiteren Schritt wiesen sie nach, dass die gesteigerte Expression der ETS-Gene durch die Fusion mit Promotorelementen von *TMPRSS2* ausgelöst wird (Tomlins, Rhodes et al. 2005; Tomlins, Mehra et al. 2006).

#### **4.4 Entwicklung einer neuen Nachweismethode von Translokationsbruchpunkten**

Mit der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode erarbeitet werden, die sich für die genomweite Suche nach unbekannten chromosomalen Bruchpunkten eignet, ohne dabei durch optische Auflösungsgrenzen konventioneller Techniken oder die Notwendigkeit von stark überexprimierten Ereignissen limitiert zu sein.

In Anlehnung an die Repräsentations-Differenzanalyse (RDA) wurde ein Verfahren entwickelt, das Unterschiede zwischen zwei Genomen in Form von differentiellen Restriktionsfragmenten identifizieren kann. Lisitsyn et al. zeigten 1993 mit Hilfe der RDA erstmals den Nachweis von differentieller viraler DNA in einem Testsystem sowie von polymorphen Restriktionsfragmenten zwischen zwei Schwestern einer Amish-Familie (Lisitsyn, Lisitsyn et al. 1993). Hierzu wurden Repräsentationen der betreffenden Genome durch die Bildung von „Amplikons“ erstellt, in denen nur Fragmente bis ca. 1000 bp vorkamen (s. u.). Diese Amplikons dienten als Tester bzw. Driver einer subtraktiven Hybridisierung. Im Falle des Testsystems wurde DNA eines Adenovirus bzw. des Bakteriophagen  $\lambda$  zu einer Probe humaner DNA gegeben und auf Grund seiner Abwesenheit im Driver als differentielles Fragment isoliert. Im Falle der Polymorphismus-Untersuchung ergaben sich differentielle Fragmente durch Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) zwischen beiden Individuen, die zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der Amplikons führten.

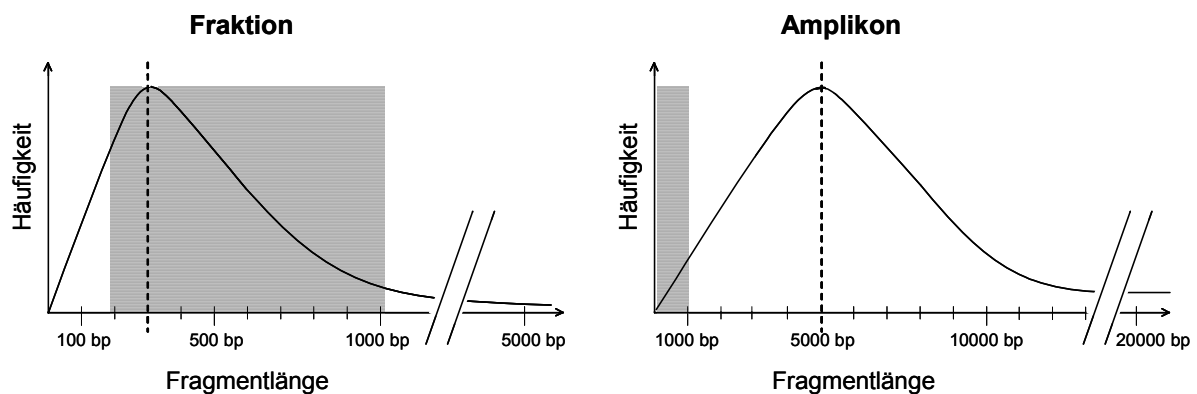
Da die Wahl des Restriktionsenzym über die Zusammensetzung eines Amplikons entscheidet, kamen in der Folge je nach Fragestellung und Organismus verschiedene Enzyme in der RDA zum Einsatz. So benutzte die Gruppe um Furuta die Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzyme Hpa II, Sac II, und Nar I um aberrante Methylierungsmuster möglicher Promotor-Regionen in humanen Melanomen mittels RDA aufzudecken (Furuta, Nobeyama et al. 2006). Auch genomische Amplifikationen und Deletionen mit onkogenen Eigenschaften wurden durch Zuhilfenahme der RDA in verschiedenen epithelialen Tumoren identifiziert. So isolierten Mu, Chen et al. differentielle Fragmente aus einer Amplifikation, die in Brustkrebszellen zu einer Überexpression des Kalziumkanals KCNK9 führte und zeigten dessen physiologisch wichtige Rolle beim humanen Mammakarzinom (Mu, Chen et al. 2003). Eine homozygot deletierte Region auf 16q23.2 identifizierten Paige et al. sowohl in einem Ovarialkarzinom als auch in den Zelllinien WX330 und HCT116, welche aus einem kleinzelligen Lungenkarzinom bzw. einem Kolonkarzinom stammten. In dieser Region befinden sich ein vorhergesagtes Tumorsuppressorgen und die *common fragile site* FRA16D (Paige, Taylor et al. 2000).

##### **4.4.1 Vergleich der neuen Nachweismethode mit der RDA**

Trotz dieser Erfolge kann die RDA nur einige der möglichen strukturellen Veränderungen in einem Genom aufdecken. Bei der Erstellung von Amplikons aus enzymatischen Repräsentationen werden Restriktionsenzymfragmente längenabhängig amplifiziert, wodurch es zu einer Abreicherung von

Sequenzen  $> 1000$  bp und so zu der erforderlichen Reduktion der Sequenzkomplexität kommt (siehe Einleitung). Dies hat die gewünschte Folge, dass chromosomale Aberrationen, die eine Umordnung von Restriktionsenzymstichstellen und somit längere bzw. kürzere Fragmente zur Folge haben, als differentielle Fragmente in Erscheinung treten. Allerdings führt dies auch dazu, dass ein Großteil der genomischen Sequenzen bei dieser Art von Analyse nicht berücksichtigt wird.

Durch die parallele Verarbeitung eines Genoms in unterschiedliche Repräsentationen können Informationen aus weiteren Amplikons gewonnen werden. So verwendeten Lisitsyn et al. Repräsentationen der Enzyme Bam HI (Erkennungssequenz GGATCC), Bgl II (AGATCT) und Hind III (AAGCTT), deren Komplexität in Bezug auf das gesamte Genom von ihnen jeweils 55mal (entspricht 1,8%), 13mal (7,7%) und 8mal (12,5%) geringer geschätzt wurde. Unter der Voraussetzung dass es keine redundanten Restriktionsfragmente gäbe, entspräche die Abdeckung des Genoms durch diese drei Amplikons ca. 22%. In dem wahrscheinlichen Fall, dass Fragmente in verschiedenen Amplikons vorkommen, wäre die Abdeckung entsprechend geringer. Somit muss selbst bei der Verwendung von mehr als drei Repräsentationen immer von einem Informationsverlust von Sequenzen ausgegangen werden, die in keinem der Amplikons vorliegen. Eine Repräsentation von häufiger schneidenden Enzymen würde zwar mehr Sequenzen in einem Amplikon berücksichtigen, erfüllte jedoch nicht die erforderliche Reduktion der Komplexität.



**Abb. 46** Angenommene linksschiefe Fragmentlängenverteilung in Restriktionsenzymrepräsentationen (durchgezogene Linien) und ihre Darstellung durch Fraktion bzw. Amplikon. Fragmente der Längen 200 – 1000 bp sind sowohl in Fraktionen als auch in Amplikons enthalten (grau unterlegte Bereiche). Links: Mse I-Repräsentation mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von ca. 300 bp (gestrichelte Linie) und ihre Fraktion; rechts: Bam HI-Repräsentation mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von ca. 5000 bp (gestrichelte Linie) und ihr Amplikon.

Diese Limitationen wurden in der vorliegenden Arbeit durch die Aufteilung von genomischen Mse I-Repräsentationen in Fraktionen weitgehend gelöst. Die eindeutige Zuordnung von jeweils ca. 10% der genomischen Fragmente zu den Fraktionen anhand ihrer Differenzierungsbasen bietet außerdem den Vorteil, dass Subtraktionen ohne redundante Ergebnisse ermöglicht werden. Die Bandbreite der in einer Fraktion enthaltenen Fragmentlängen entspricht mit ca. 200 – 1000 bp derjenigen, wie von

Lisitsyn et al. für Amplikons von Bam HI-, Bgl II- und Hind III-Repräsentationen angenommen wurde (Lisitsyn, Lisitsyn et al. 1993). Auch hier kommt es demnach unter Umständen zum Informationsverlust über mögliche Translokationsbruchpunkte in Fragmenten > 1000 bp. Bei einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 300 bp ist der Anteil an Mse I-Fragmenten > 1000 bp jedoch deutlich geringer, als bei den seltener schneidenden Enzymen Bam HI, Bgl II und Hind III, welche Fragmente von durchschnittlich ca. 5000 bp erzeugen. Eine Fraktion umfasst mit ihrer durchschnittlichen Fragmentlänge von ebenfalls ca. 300 bp den größten Teil an ihr zugehörigen Sequenzen, wohingegen ein Amplikon mit einer durchschnittlichen Fragmentlänge von 600 bp (Angabe aus Lisitsyn 1995) nur einen geringen Teil einer Repräsentation abdeckt (Abb. 46).

Der Verlust von Fragmenten > 1000 bp in den Fraktionen war höchst wahrscheinlich durch die Dynamik der Fraktionierungs-PCR begründet und konnte durch verschiedene Maßnahmen, wie z. B. eine Verlängerung der Elongationsphase nicht wesentlich beeinflusst werden. Unter Umständen waren große Fragmente aber auch schon nach der primären Mse I-Adapter PCR im Vergleich zu kürzeren Fragmenten unterrepräsentiert. Zwar wurden große und kleine Fragmente mittels spezifischer Kontroll-PCR gleichermaßen in Mse I-Repräsentationen nachgewiesen, allerdings ist diese so sensitiv, dass sie eventuelle Konzentrationsunterschiede zwischen langen und kürzeren Fragmenten nicht aufdecken kann.

#### **4.4.2 Bewertung der Fraktionierung**

Das grundlegende Prinzip zur Einteilung der Fraktionen basierte auf den Differenzierungsbasen, die jedes Fragment eindeutig einer Fraktion zuteilen. In der Praxis war die reproduzierbare Trennung zwischen gewünschten und unerwünschten Fragmenten gefordert und die Möglichkeit, dies durch eine sensitive Nachweismethode zu kontrollieren. Mit ihrer Nachweisgrenze von zwei bis vier Kopien eines Testfragments war die spezifische Kontroll-PCR ein probates Mittel, um die Reinheit von Fraktionen zu beurteilen.

Komplexe Fragmentgemische, wie sie Mse I-Repräsentationen aus humanen Genomen darstellen, in Fraktionen aufzuteilen, erwies sich als schwierig. Mit verschiedenen Strategien konnten ähnliche Erfolge erzielt werden, die in der Regel darin bestanden, dass die Einfachen Fraktionen ohne nennenswerte Verunreinigungen durch fraktionsfremde Fragmente hergestellt werden konnten. Zwar konnten auch aus den Gemischten Fraktionen die meisten unerwünschten Fragmente relativ unproblematisch abgetrennt werden. Hierbei handelte es sich allerdings nur um Fragmente, die keine oder nur eine Bindestelle für einen der beiden Fraktionierungsprimer trugen.

Zur Anreicherung einer Fraktion wurden zum einen fraktionsspezifische Primer verwendet, die eine Spezifität für die ubiquitäre Bindestelle Lib1 und zusätzlich für eine der vier Differenzierungsbasen aufwiesen. Zum anderen wurden spezifische Adaptersequenz an Fragmente einer Fraktion ligiert und diese anschließend darüber amplifiziert. Die ersten Versuche zur Fraktionierung wurden mittels fraktionsspezifischer Primer durchgeführt (siehe 3.5). Bei ihnen war die Gefahr eines Fehlprimings

von unerwünschten Fragmenten durch ihre Übereinstimmung von 15 – 20 Basen mit der Bindestelle Lib1 hoch. Die Aktivität der DNA-Polymerase sollte daher durch stringente PCR-Bedingungen so beeinflusst werden, dass ein Fragment nur bei passenden Differenzierungsbasen amplifiziert werden konnte. Zwar konnten alle Fraktionen mit diesem Vorgehen präferentiell angereichert werden, jedoch waren in ihnen häufig fraktionsfremde Fragmente enthalten. Offenbar konnten die Reaktionsbedingungen nicht so exakt eingestellt werden, dass eine Unterscheidung zwischen erwünschten und unerwünschten Fragmenten reproduzierbar erreicht wurde. Durch die Einführung von fraktionsspezifischen Adaptoren konnten unerwünschte Fragmente bei der Anreicherung einer Fraktion wesentlich besser abgetrennt werden (siehe 3.2). Obwohl verschiedene Protokolle zur Herstellung der Einfachen Fraktionen geeignet waren, konnten die Gemischten Fraktionen auch hier zunächst nicht vollständig rein angereichert werden.

Die Schwierigkeit hierbei war, dass durch die Positivselektion von Fragmenten mit einer bestimmten Differenzierungsbase neben den erwünschten gemischten Fragmenten auch einfache Fragmente vorhanden waren, die die betreffende Differenzierungsbase an beiden Enden und somit zwei passende Bindestellen für Fraktionierungsprimer aufwiesen. Diese wurden in der Fraktionierung exponentiell amplifiziert und konnten nicht durch einen Verdau mit der *Mung Bean* Nuklease abgebaut werden. Obwohl zahlreiche Versuche unternommen wurden, die theoretisch zur Eliminierung dieser Fragmente aus dem Reaktionsansatz führen sollten, gelang dies nicht. So hätte eine zweite Positivselektion der Gemischten Fraktion über deren andere Differenzierungsbase zum Verlust der exponentiell angereicherten einfachen Fragmente führen müssen. Dennoch wurden diese immer wieder in Gemischten Fraktionen nachgewiesen.

Wahrscheinlich lag dies hauptsächlich an der Verwendung von paramagnetischen Partikeln, an deren Oberfläche DNA-Fragmente unspezifisch haften blieben. Dies wurde aus der Tatsache geschlossen, dass die Stringenz der Waschbedingungen für die Partikel einen besonderen Einfluss auf die Reinheit der Fraktionen hatte. So führten bei der Herstellung der Einfachen Fraktionen Waschpuffer zu reinen Fraktionen, die die gewünschten Fragmente zwar denaturierten, aber auch stringent genug waren, unerwünschte Fragmente aus dem Ansatz zu entfernen. Dieselben Waschbedingungen reichten nicht aus, um die unerwünschte Einfache Fraktion aus einer Gemischten Fraktion zu entfernen. Offenbar konnten Fragmente, die zu Beginn des Protokolls über vorhandene Primerbindestellen exponentiell amplifiziert wurden, im Folgenden nicht mehr von den Partikeln gewaschen werden.

Folglich wurde versucht, die Amplifikation der unerwünschten Einfachen Fraktion bei der Anreicherung einer Gemischten Fraktion mit Hilfe von *clamp*-Adaptoren in einer Suppressions-PCR zu unterdrücken (3.2.3.2.1). Dass auch diese Strategie scheiterte, wäre möglicherweise durch die Wahl ungeeigneter PCR-Bedingungen zu erklären. Dies scheint jedoch unwahrscheinlich, da in einem Testexperiment unter identischen Bedingungen die Amplifikation von einem spezifischen *Mse* I-Fragment mit *clamp*-Adaptoren unterdrückt werden konnte. Daher scheint es wahrscheinlicher, dass die



Suppressions-PCR im Kontext des hier verwendeten komplexen Fragmentgemisches nicht ausreichend gut funktionierte.

Die beschriebenen Ergebnisse sprechen dafür, dass eine effektive Unterdrückung von unerwünschten Fragmenten nur erreicht werden konnte, wenn diese keine passenden Primerbindestellen aufwiesen. Daher sollten die Bindestellen an den besagten Fragmenten eliminiert werden. Dies wurde erreicht, indem nur einer der beiden Adapter der gemischten Fragmente einer Auffüllreaktion unterzogen wurde und so nur hier eine Bindestelle synthetisiert wurde. Über den nicht aufgefüllten zweiten Adapter wurden die Fragmente an paramagnetische Partikel gekoppelt und positiv selektiert. Dann erfolgte eine Fraktionierungs-PCR, die Primer für beide Adapter enthielt. Durch die Elongation ihres Gegenstrangs im ersten Zyklus der PCR wurde an den erwünschten Fragmenten die zweite Bindestelle synthetisiert, so dass sie ab dem zweiten Zyklus exponentiell amplifiziert werden konnten. Dieses Protokoll führte zu den angestrebten reinen Fraktionen (3.2.3.2.2).

### 4.4.3 Bewertung der Subtraktion

#### 4.4.3.1 Nachweisgrenze von differentiellen Fragmenten

Anhand von Testsystemen konnte gezeigt werden, dass die subtraktive Hybridisierung von Fraktionen aus genomischen Mse I-Repräsentationen zur Identifizierung von differentiellen Fragmenten geeignet ist. Dies war mit allen getesteten Fraktionen möglich.

Die Nachweisgrenze von differentiellen Fragmenten in den Testsystemen wurde als ein Vielfaches von einem Mse I-Fragment angegeben, das aus dem *single copy* Gen *AGTR* stammt und somit in nur zwei Kopien im Genom einer diploiden Zelle vorliegt. Dies wurde als relevante Größe angesehen, da diese Zahl direkt Auskunft darüber gibt, wie häufig ein Translokationsbruchpunkt in einer Zelle vorliegen muss, um mit der Methode detektiert werden zu können. Bei einer Nachweisgrenze von 0,5 könnte ein Fragment aus einem einmaligen Ereignis identifiziert werden, bei einer Nachweisgrenze von  $> 1$  würden nur Ereignisse aufgedeckt, die amplifiziert vorliegen. In der Literatur ist die Amplifikation eines Translokationsbruchpunktes in Tumorzellen beispielsweise an CML-Zellen eines Patienten mit bis zu 60facher genomischer Amplifikation des *BCR-ABL* Fusionsgens beschrieben worden (Gadzicki, von Neuhoff et al. 2005).

Die niedrigsten Nachweisgrenzen, die bei der Subtraktion der Testsysteme GFPmut II und *BCR-abl* erreicht werden konnten, entsprachen dem sechs- bis zwölffachen der Kopienzahl des Mse I-Fragments aus *AGTR*. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die tatsächliche Nachweisgrenze noch niedriger anzusetzen ist. Zwar schlug ein Versuch fehl, das ca. 1,3fache Äquivalent des *AGTR*-Fragments (entspricht 2,6 Kopien) mit dem Testsystem GFPmut II zu detektieren (nicht gezeigt). Dieses Experiment wurde jedoch nicht unter den später als besonders günstig ermittelten Bedingungen durchgeführt. Unter den Ergebnissen der Subtraktion war ein differentielles Fragment, das nachweisbar während der Fraktionierung des Testers durch einen Austausch der Differenzierungsbase generiert worden war (3.4.3 und s. u.). Es erscheint unwahrscheinlich, dass dieses Ereignis mehr als

einmal vorgekommen sein könnte, und weist darauf hin, dass möglicherweise eine einzige Kopie eines Translokationsfragments nachgewiesen werden kann.

Im Vergleich zum Originalprotokoll der RDA konnte durch eine Erhöhung der Testermenge in allen Depletionsrunden aber vor allem in der dritten Depletionsrunde die Anreicherung von differentiellen Fragmenten verbessert werden. Offenbar entsprach die verwendete Testermenge nicht der tatsächlich eingesetzten Menge an humanen Testersequenzen. Enzyme sind häufig mit bakteriellen DNA-Sequenzen verunreinigt (Hughes, Beck et al. 1994; Corless, Guiver et al. 2000). Da das Fraktionierungsprotokoll zahlreiche Enzym-Reaktionen umfasst, kann davon ausgegangen werden, dass sich Fraktionen zu einem gewissen Prozentsatz auch aus bakteriellen Sequenzen zusammensetzen. Dies würde erklären, warum sich eine Erhöhung der Testermenge positiv auf den Nachweis von differentiellen Fragmenten auswirkte.

#### 4.4.3.2 Falsch positive Subtraktionsergebnisse

In fast allen Subtraktionsexperimenten kam es – unabhängig von den verwendeten Fraktionen – zu der Anreicherung von Banden, deren Länge nicht der Länge der differentiellen Fragmente der Testsysteme entsprach und die daher als falsch positive Ergebnisse gewertet werden mussten. Um die Ursachen für die Anreicherung dieser Fragmente aufzuklären, wurden ihre Sequenzen mit elektronischen Datenbanken verglichen und ihre Adaptersequenzen, Mse I-Schnittstellen und Differenzierungsbasen analysiert. In allen Fällen flankierten die Sequenzen der Subtraktionsprimer die Fragmente. Es konnte ausgeschlossen werden, dass eine unerwünschte Bindung der Subtraktionsprimer J21 bzw. R21 an genomische Sequenzen stattgefunden hatte, da ebenfalls in allen Fällen Mse I-Schnittstellen im Anschluss an die Primersequenzen vorhanden waren. Vielmehr wurde deutlich, dass ihre Anreicherung in engem Zusammenhang mit ihren spezifischen Sequenzmerkmalen stand.

Die Banden stammten jeweils zu ca. 50% von bakteriellen und humanen Sequenzen. Sie wurden mit Hilfe des *multiple sequence alignment* Programms ClustalW (*The European Bioinformatics Institute, EBI*) auf typische Sequenzmerkmale untersucht. Das Programm berechnet die beste Übereinstimmung von ausgesuchten Sequenzen und zeigt so Übereinstimmungen und Unterschiede auf. Es wurden in drei Fällen übereinstimmende Abschnitte von 44 Basen zwischen drei bakteriellen Sequenzen gefunden werden. Da sonst keine Übereinstimmung von bestimmten Sequenzabschnitten auftrat, wurde daraus geschlossen, dass die falsch positive Anreicherung nicht durch das Vorkommen von bestimmten Basenfolgen begründet war.

Als Ursache für die bakteriellen Sequenzen wurden die bereits erwähnten Kontaminationen von rekombinant hergestellten Enzymen in Betracht gezogen (Hughes, Beck et al. 1994; Corless, Guiver et al. 2000). Schon bei der Herstellung von genomischen Mse I-Repräsentationen kann es zu diesen bakteriellen DNA-Kontaminationen kommen. Im Verlauf des Fraktionierungsprotokolls werden Tester- und Driver-DNA in unabhängigen Ansätzen unter der Verwendung zahlreicher Enzyme hergestellt. Wenn die verwendeten Enzyme unterschiedlich mit seltenen bakteriellen DNA-Fragmenten verunreinigt sind, verhalten sich diese in der Subtraktion von Tester und Driver wie

differentielle Fragmente. Da die betreffenden falsch positiven Ergebnisse bis auf sehr wenige Ausnahmen die Differenzierungsbasen der jeweiligen Fraktion trugen, kann davon ausgegangen werden, dass sie spätestens während der Fraktionierung in die Proben gelangten. Letztlich konnte für die bakteriellen Fragmente nicht gezeigt werden, dass sie im Tester aber nicht im Driver vorhanden waren, da aufgrund der mit bakterieller DNA verunreinigten Enzyme keine Kontroll-PCR durchgeführt werden konnte, die in einer Wasserkontrolle kein Signal erzeugte. Das Problem von bakteriellen Kontaminationen und damit von bakteriellen falsch positiven Ergebnissen der Subtraktion könnte durch die Verfügbarkeit von ultra-reinen Enzymen in Zukunft eventuell verringert werden.

#### ***4.4.3.2.1 Falsch positive Ereignisse können durch die Fraktionierung begründet sein***

Als Ursache für falsch positiv angereicherte Fragmente humanen Ursprungs wurde vermutet, dass es sich um differentielle Fragmente zwischen Tester und Driver handelte, die während der Fraktionierung entstanden waren. So müssten prinzipiell alle Vorgänge, die den Gewinn eines Fragments im Tester bzw. den Verlust eines Fragments im Driver zur Folge haben, zu einem falsch positiven Ergebnis führen (Tab. 40).

Die große Mehrheit der in Subtraktionsexperimenten falsch positiv angereicherten humanen Sequenzen wies die gleichen Differenzierungsbasen wie Tester- und Driver-Fraktionen auf. Handelte es sich hierbei um tatsächliche Unterschiede zwischen Tester und Driver (differentielle Fragmente), so wären dafür zwei Ursachen denkbar. Neben dem Verlust eines solchen Fragments aus der Driverfraktion wäre es auch möglich, dass der zufällige Basenaustausch in einer Mse I-Schnittstelle oder einer Differenzierungsbase ein neues Fragment in der Testerfraktion generiert.

**Tab. 40** Mögliche Ursachen für das Entstehen von differentiellen Fragmenten durch die Fraktionierung

Differentielles Fragment zwischen Tester und Driver	
Differenzierungsbasen wie Tester und Driver	andere Differenzierungsbasen
(1) Verlust aus dem Driver	Fragment nicht aus dem Tester entfernt
(2) Gewinn im Tester	
- neue/veränderte Mse I-Schnittstelle(n) - Differenzierungsbase(n) ursprünglich anders	

Wenn der Verlust einzelner Fragmente in der Driverfraktion die Ursache für falsch positive Ergebnisse wäre, wären vor allem Fragmente mit einer Länge von knapp unter 200 bp oder knapp über 1000 bp gehäuft aufgetreten. In diesen Bereichen müsste es häufiger zu Unterschieden zwischen Tester und Driver kommen, da sie in den Fraktionen die untere bzw. obere Grenze nachweisbarer Fragmente darstellen. In Bezug auf einzelne Fragmente ist die Zusammensetzung von Fraktionen in diesem Bereich möglicherweise variabel.

Tatsächlich wurden in den meisten Fällen aber Fragmente angereichert, die zwischen ca. 200 und 400 bp lang waren und nie Fragmente, die größer als 703 bp waren. Die Möglichkeit eines zufälligen

Verlustes der Fragmente im Driver wurde zudem experimentell untersucht, indem Subtraktionsergebnisse miteinander verglichen wurden, für die eine bzw. drei unabhängig voneinander hergestellte Driverfraktionen verwendet wurden. In beiden Subtraktionen wurden die gleichen Fragmente angereichert. Daher konnte für Fragmente > 200 bp mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass ein Verlust im Driver zu ihrer Anreicherung geführt hatte. Bei Fragmenten zwischen ca. 150 – 200 bp war dies zwar letztlich nicht möglich, aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Sequenzcharakteristika (s. u.) mit den längeren Fragmenten wurde ihr Verlust im Driver jedoch als wenig plausibel bewertet.

Die Tatsache, dass manchmal einzelne Basen in den Fragmenten nicht mit der Sequenz der Datenbanken und den in ihnen vermerkten Polymorphismen (SNPs) übereinstimmten, lässt darauf schließen, dass es durch Fehler der DNA-Polymerase während der Fraktionierung zu künstlich eingefügten „Punktmutationen“ kommen kann. In einer Subtraktion von GG-Fraktionen wurde ein Fragment angereichert, das laut Sequenzierungsreaktion die Differenzierungsbasen GG trug, in der Datenbank USCS *Human Genome Bioinformatics* allerdings als AG-Fragment abgelegt ist. Dieses Fragment wurde daraufhin mittels spezifischer Kontroll-PCR in der entsprechenden Tester-Fraktion aber nicht in der Driver-Fraktion nachgewiesen. Da diese aber aus dem gleichen Ausgangsmaterial hergestellt worden waren, konnte es nur durch einen Polymerasefehler zu der veränderten Differenzierungsbase gekommen sein. Alle anderen Fragmente mit den Differenzierungsbasen der verwendeten Fraktionen zeigten im Vergleich mit Datenbanken allerdings keine Sequenzauffälligkeiten, die eine Erklärung für ihr Vorhandensein nur im Tester hätten geben können.

Von 42 falsch positiven Banden, die in Subtraktionen angereichert wurden, trugen vier Sequenzen nicht die Differenzierungsbasen der verwendeten Fraktionen. Im Durchschnitt konnten ca. 95% aller fraktionsfremden Fragmente aus einer Fraktion abgetrennt werden (3.2.5). Wahrscheinlich handelte es sich in diesen Fällen um fraktionsfremde Fragmente, die nur im Tester vorhanden waren und daher als differentielle Ereignisse in der Subtraktion angereichert wurden. Allerdings konnte dies nicht mit einer spezifischen Kontroll-PCR nachgewiesen werden, da für diese Sequenzen aufgrund ihrer geringen Komplexität keine spezifischen Primer generiert werden konnten (s. u.).

Die bisher beschriebenen Ergebnisse waren durch seltene Vorkommnisse in der Fraktionierung begründet. Sie beinhalteten keinen Informationswert über chromosomale Veränderungen in einem Probenmaterial und stellten gewissermaßen den „Hintergrund“ für die Detektion von Bruchpunktfragmenten mit dieser Methode dar. Da sie nur sehr sporadisch auftraten, wurden sie im Hinblick auf den Erfolg der Methode nicht als störend empfunden.

#### ***4.4.3.2.2 Falsch positive Ergebnisse können durch Sequenzcharakteristika begründet sein***

Humane Sequenzen, die in Subtraktionen angereichert wurden, zählten zu einem großen Teil (ca. 86%) zu den Wiederholungssequenzen. Daher wurde angenommen, dass häufige Sequenzen sich durch eine Subtraktion weniger gut eliminieren lassen, als seltene Sequenzen. Man könnte vermuten,

dass repetitive Sequenzen während der subtraktiven Hybridisierung trotz des Überschusses an Driver mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Tester/Tester-Hybride bilden als nicht repetitive Sequenzen und in der Folge exponentiell angereichert werden können. Entgegen dieser Vermutung konnte weder eine Erhöhung der Drivermenge, noch die Zugabe von  $C_0t$ -1 DNA in den Driver eine Unterdrückung dieser Sequenzen bewirken.

Es wäre auch denkbar, dass repetitive Sequenzen aufgrund von partiellen Übereinstimmungen miteinander hybridisieren und ihre nicht übereinstimmenden Regionen einzelsträngige Überhänge bilden. Diese würden in der nachfolgenden Reaktion zunächst aufgefüllt und die Fragmente dann exponentiell amplifiziert. Bei einer starken Ähnlichkeit der Sequenzen könnte das entstandene Fragment in einer Datenbankanalyse wahrscheinlich nicht eindeutig einer bzw. zwei chromosomalen Regionen zugeordnet werden. Bei einer weniger starken Ähnlichkeit der überhängenden Enden würde sich ein solches Fragment wie ein Translokationsereignis darstellen. Die Anreicherung von solchen Translokationsartefakten aus repetitiven Elementen trat in RDA-Experimenten von Hansen-Hagge et al. zur Identifizierung von tumorspezifischen Sequenzen von kutanen T-Zell-Lymphomen auf. Sie wiesen entweder eine G-reiche Region ( $> 30$  bp) oder GA-Motive ( $> 50$  bp) oder CA-repeats ( $> 50$  bp) auf. Repetitive Elemente der Klassen LINE, SINE oder LTR traten im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen jedoch mit einer Ausnahme nicht auf. Die Gruppe entwickelte ein Protokoll zur Unterdrückung dieser Sequenzen, das sie *ligation mediated subtraction* (LIMES) nannten, da ihm ein Reaktionsschritt mit einer thermostabilen Ligase hinzugefügt wurde (Hansen-Hagge, Trefzer et al. 2001). Diese Ligase wurde eingesetzt, um testerspezifische Adapter nach der subtraktiven Hybridisierung hochspezifisch nur an Tester/Tester-Homodimere zu ligieren und diese vor einer PCR-Amplifikation mittels paramagnetischen Partikeln von den übrigen Hybriden zu trennen. Auf diese Art und Weise konnten Hansen-Hagge et al. die Bildung von Artefakten aus repetitiven Sequenzen verhindern.

Von insgesamt 18 humanen repetitiven Sequenzen aus den vorliegenden Ergebnissen waren vier nicht eindeutig chromosomalen Regionen zuzuordnen. Nimmt man an, dass sie durch eine Teilhybridisierung zwischen ähnlichen Motiven entstanden sind, könnte ein LIMES-Protokoll bei der Subtraktion von Fraktionen eine Reduktion falsch positiver Ergebnisse erwirken.

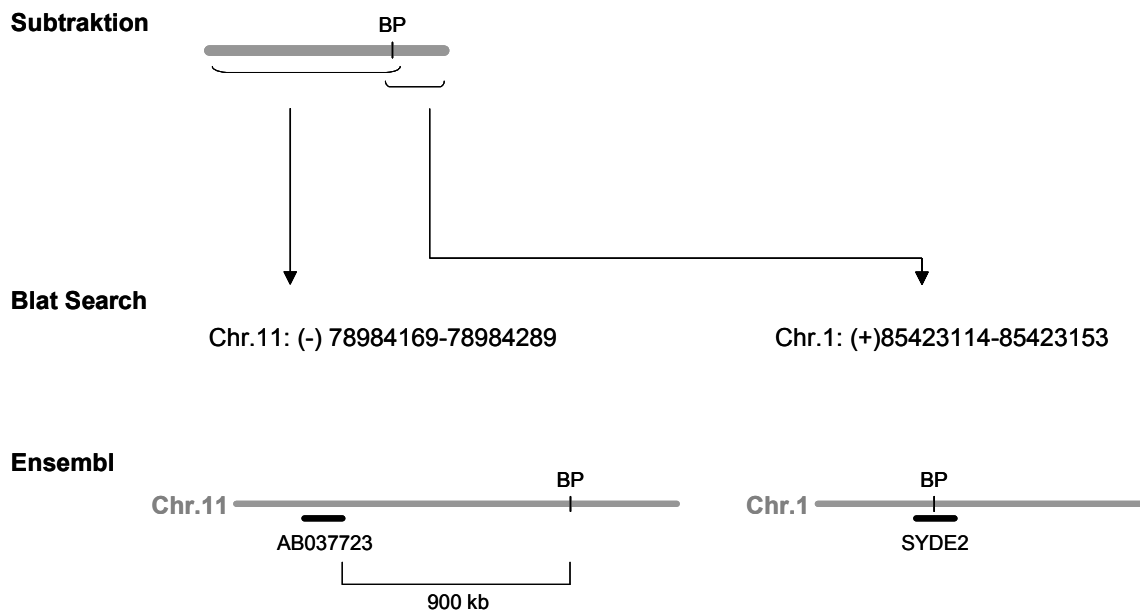
#### **4.4.3.3 Identifizierung eines Fragments mit mutmaßlichem Translokationsbruchpunkt**

Um die Anwendbarkeit der Methode auf Tumor-DNA zu testen, wurde ein Tester aus der Zelllinie PT1590, die aus einem Primärtumor eines Patienten mit Ösophaguskarzinom gewonnen wurde, sowie ein Driver aus einem Normalzellpool des Patienten hergestellt. Die Eigenschaften eines Fragments, das durch die Subtraktion der GG-Fraktionen identifiziert wurde, waren sowohl charakteristisch für Translokationsbruchpunkte als auch für Translokationsartefakte. Auf den betroffenen Loci von Chromosom 11 und 1, von denen je 126 bzw. 40 bp des Fragmentes stammten, fanden sich die *Alu*-Wiederholungssequenzen *AluJb* bzw. *AluJo*. Es gab keinen eindeutigen Bruchpunkt im Fragment

sondern eine Strecke von 14 bp, die beiden Sequenzen gemein war. Auf einer Länge von 120 bp fanden sich 61 bp Übereinstimmungen zwischen beiden Abschnitten und es handelte sich mit einem Verhältnis zwischen G/C zu A/T von 67:53 um eine GC-reiche Sequenz. Einerseits ist in der Literatur sowohl beschrieben, dass es durch eine Rekombination an *Alu*-Elementen zu Translokationen kommen kann, als auch, dass an Bruchpunkten mehrere Basenpaare von beiden Sequenzen übereinstimmen können (Kanoë, Nakayama et al. 1999, Kolomietz, Meyn et al. 2002, Portera, Venturin et al. 2006). Andererseits sprechen diese Punkte auch für die Entstehung eines Artefakts durch eine Teilhybridisierung ähnlicher Sequenzen (s. o.). Daher wurde mit Hilfe von PCR-Primern, die den mutmaßlichen Bruchpunkt überspannten, das Vorhandensein des Fragments im Tester und Driver untersucht. Da die Primer aufgrund ihrer Spezifität für Basen aus *Alu*-Elementen auf verschiedenen Chromosomen banden, wurden sowohl aus dem Tester als auch dem Driver PCR-Produkte generiert. Mit der Sequenzierung der spezifischen PCR-Produkte wurde das Vorhandensein des Fragments im Tester eindeutig nachgewiesen. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich nicht um ein Translokationsartefakt handelte, das erst während der Subtraktion durch eine Teilhybridisierung ähnlicher Sequenzabschnitte entstand, sondern höchst wahrscheinlich um ein Fragment mit einem Translokationsbruchpunkt. Zwar konnte das Vorhandensein des Fragmentes im Driver durch eine Sequenzierung des spezifischen PCR-Produkts nicht vollständig ausgeschlossen werden, da es sich dabei um eine Mischsequenz handelte. Allerdings wich die editierte Sequenz in 12 von 93 Basen von der mutmaßlichen Translokationssequenz ab und ergab bei einer Datenbankrecherche mittels USCS *Genome Bioinformatics/Blat Search* keine Treffer für die relevanten Regionen auf Chromosomen 11 oder 1. Der endgültige Beweis für die Translokation in der Zelllinie könnte durch eine Kontroll-PCR mittels spezifischer Primer für das Bruchpunktfragment erbracht werden, die in der genomischen DNA der PT1590-Zellen in nicht repetitiven Abschnitten binden.

In den betroffenen Regionen 11q14.1 und 1p22.3 liegen neben mehreren unbekannten Genen, *expressed sequence tags* (EST) und *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNA) auch einige bereits beschriebene Gene. Auf Chromosom 11 befindet sich in einer Entfernung von ca. 940 kb vom Bruchpunkt das Gen AB037723 (Chr.11 (-) 78041977-78175696), das auch unter den Namen *ODZ4*, *KIAA1302* und *TNM4* bekannt ist (Abb. 47). Über die Funktion seines Genprodukts ist nichts Näheres bekannt, es wird allerdings eine Rolle bei der Signalübermittlung vorgeschlagen (Quelle: UniProt). Auf Chromosom 1 wird durch den Bruchpunkt das Gen *SYDE2* (Chr.1 (+) 85395944-85439043) im Intron 2–3 (85421472-85428327) unterbrochen, so dass Exon 1 und 2 seiner insgesamt sieben Exons mit der Sequenz von Chromosom 11 fusioniert werden. *SYDE2* wirkt ebenfalls bei der Signalverarbeitung in der Zelle mit. Das Genprodukt SYDE2 gehört zu der Familie der RhoGTPasen, welche wichtige Regulatoren bei Prozessen wie dem Umbau des Zytoskeletts, der Zellmotilität und der Zellzyklus-Progression haben. Rho-Proteine gehören zu der Superfamilie Ras der kleinen GTPasen, die in Abhängigkeit von der Zusammensetzung eines gebundenen Guaninnukleotids

zwischen einem aktiven und einem inaktiven Zustand wechseln. Im aktiven Zustand leiten sie Signale von Transmembranrezeptoren ins Zellinnere weiter, indem sie andere Signalproteine phosphorylieren.



**Abb. 47** Mittels Subtraktion identifiziertes Fragment aus PT1590. Die Teilstücke konnten den Regionen Chr.11 (-) 78984169-78984169 und Chr.1 (+) 85423114-85423153 zugeordnet werden (*USCS Genome Bioinformatics, Blat Search*). Die mutmaßlichen Bruchpunkte liegen 900 kb von dem Gen AB037732 entfernt (Chr.11) bzw. in dem Gen SYDE2 (Chr.1; *Ensembl Human Map View*)

Drei Gruppen von regulatorischen Proteinen, nämlich die Guanin-Dissoziierungsinhibitoren (GDIs), die Guanin-Austauschfaktoren (GEFs) und die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) kontrollieren die Balance zwischen aktiven und inaktiven Rho-Proteinen. Die veränderte Expression von diesen regulatorischen Proteinen wurde bereits in zahlreichen humanen Tumorzelllinien beschrieben. So zeigten Unwin et al. 2005, dass durch die Transfektion mit BCR-ABL die Aktivierung eines GDIs gestört und somit der Rho-Kinase-Signalweg aktiviert war. In diesen Zellen inhibierte die Coexpression einer dominant-negativen RhoGTPase sowohl die DNA-Synthese als auch die Migration der Zellen (Unwin, Sternberg et al. 2005). Des weiteren wurde eine Subgruppe von Patienten mit einer Chronisch Lymphatischen B-Zell Leukämie (B-CLL) beschrieben, bei der das Gen des GTPase aktivierenden Proteins ARHGAP20 transloziert war und in der Folge überexprimiert wurde (Kalla, Nentwich et al. 2005). Es wäre also durchaus möglich, dass die Translokation zwischen den Chromosomen 11 und 1 zu einer gestörten Signaltransduktion führt, die zu dem malignen Phänotyp der PT1590-Zellen beiträgt.

## 4.5 Mögliche Bedeutung von Fusionsgenen in der Karzinogenese

### 4.5.1 Fusionsgene wirken Zelltyp-spezifisch

Das onkogene Potential von Fusionsgenen wurde häufig durch die Transformation von Mausfibroblasten der Zelllinie NIH3T3 *in vitro* demonstriert. Allerdings scheint ihre Wirkungsweise vom zellulären Kontext abzuhängen. So aktiviert das Fusionsgen *E2a-Pbx1* in NIH3T3-Zellen andere Gene als in myeloischen Zellen, in denen es *in vivo* eine Pro-B-Zell Leukämie auslöst (Fu and Kamps 1997). Zwar zeigten Hu-Lieskovan et al., dass *EWS-FLI1*, das in ca. 80-90% der Fälle beim Ewing-Sarkom auftritt, das existierende Differenzierungsprogramm einer embryonalen Rhabdomyosarkomlinie unterdrückt und einen dem Ewing-Sarkom ähnlichen Phänotyp auslöst (Hu-Lieskovan, Zhang et al. 2005). Doch spricht der Großteil der in der Literatur beschriebenen Daten dafür, dass die Transformation durch ein Fusionsgen von den gewebetypischen Eigenschaften der Zielzelle beeinflusst wird (Corral and al. 1996; Castellanos and al. 1997; Zou, Ichikawa et al. 2005). Offenbar können Fusionsgene eine toxische Wirkung haben, die von manchen Zellen in Abhängigkeit von ihrer Genexpression überwunden werden kann. So löste beispielsweise das mit der Akuten Promyeloischen Leukämie assoziierte Fusionsgen *PML-RARA* nach einer Transfektion mit induzierbaren Expressionsvektoren in Fibroblasten-Zelllinien einen Wachstumsarrest und Zelltod aus, nicht aber in hämatopoetischen Zelllinien (Ferrucci, Grignani et al. 1997).

F. G. Barr entwickelte unter anderem aufgrund dieser Beobachtungen ein Modell, das eine Toleranz gegenüber dem toxischen Effekt eines Fusionsgenproduktes in einer Zelle voraussetzt, damit es zu ihrer malignen Transformation kommen kann. Diese Toleranz werde auf mehreren Ebenen des Transformationsprozesses durch Faktoren der Genexpression und Genproduktfunktion sowie durch kollaborierende zelluläre Faktoren generiert und sei in hohem Maße Zelltyp-spezifisch (Barr 1998).

Diese Zelltyp-Spezifität zeigt sich deutlich durch die Assoziation von Fusionsgenen mit definierten Subtypen einzelner Tumorentitäten, wie sie in der Regel bei hämatologischen Tumoren und Sarkomen auftreten (Panagopoulos, Hoglund et al. 1996; Arvand and Denny 2001; Shing, McMullan et al. 2003). Es sind verschiedene Szenarien denkbar, wie es zu der beobachteten Assoziation von Translokationen mit bestimmten Subtypen kommen könnte. Einerseits könnte der Translokationsprozess durch die Charakteristika der betroffenen Zelle beeinflusst bzw. durch Zelltyp-spezifische Mechanismen ausgelöst werden. So scheint beispielsweise eine räumliche Nähe zwischen Translokationspartnern im Interphasekern eine Rolle zu spielen, die auf eine funktionelle und damit differenzierungsabhängige dreidimensionale Anordnung des Genoms zurück zu führen sein kann (Roix, McQueen et al. 2003; Kosak and Groudine 2004; Roccato, Bressan et al. 2005). Andererseits könnten Translokationen in wenig differenzierten Vorläuferzellen eines Organs entstehen und in diesen die Entwicklung zu einem bestimmten Zelltyp auslösen. Für diese Überlegung spricht die Tatsache, dass translozierte Gene oftmals Teil von zellulären Differenzierungsprogrammen sind. So stammt die DNA-Bindedomäne des Fusionsproteins PAX3-FKHR von dem Transkriptionsfaktor PAX3, dessen Expression die myogene

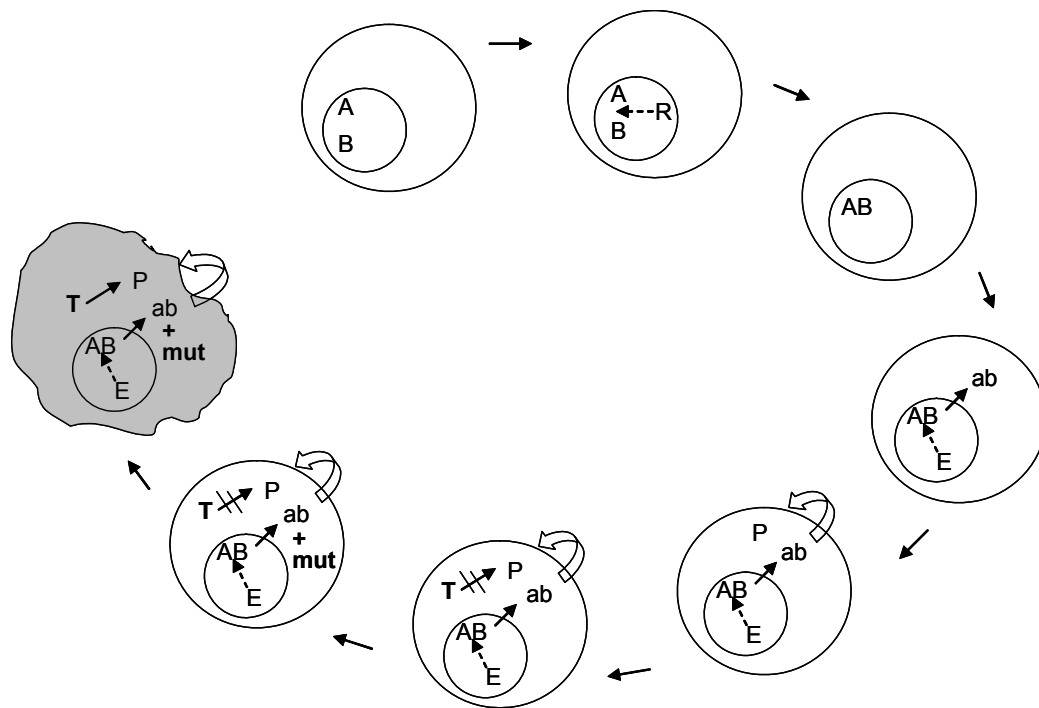


Differenzierung in einer pluripotenten Stammzelllinie der Maus auslösen kann (Ridgeway and Skerjanc 2001). Rhabdomyosarkome, in denen PAX3 oder auch PAX7 aberrant reguliert werden, zeigen Expressionsprofile, die denen von myogenen Vorläuferzellen ähneln (Blandford, Barr et al. 2006).

#### 4.5.2 Ein Modell der Transformation von Epithelzellen durch Fusionsgene

Es gibt Hinweise darauf, dass Translokationen und ihre Fusionsgene in Karzinomen eine vergleichbare Rolle spielen könnten, wie in Leukämien und Sarkomen. So wurde die Assoziation von Fusionsgenen mit bestimmten Subtypen auch bei den epithelialen Tumoren beobachtet. Die seltene (in der Literatur wurden insgesamt zehn Fälle beschrieben) aber wiederholt auftretende Translokation t(15;19) und ihr Fusionsgen *Brd4-NUT* wurde sowohl in einem Lungenkarzinom als auch in aggressiven Karzinomen der Mittellinien-Organe identifiziert (French, Miyoshi et al. 2003; Haruki, Kawaguchi et al. 2005). Durch *Brd4-NUT* wird ein anderer Subtyp der letztgenannten Karzinome hervorgerufen, als durch Translokationen, die NUT mit anderen Genen fusionieren (French, Kutok et al. 2004). Des Weiteren konnten Tomlins, Mehra et al. kürzlich Genfusionen zwischen *TMPRSS2* und den ETS-Transkriptionsfaktoren *ERG*, *ETV1* oder *ETV4* in der Mehrheit von Prostatakarzinomen nachweisen. Jedes der drei Fusionsgene definiert einen Subtyp des Prostatakarzinoms. Möglicherweise überträgt *TMPRSS2*, das in normalem und neoplastischem Prostatagewebe exprimiert wird, eine androgenabhängige Induzierbarkeit auf die Transkriptionsfaktoren (Tomlins, Rhodes et al. 2005; Tomlins, Mehra et al. 2006).

Offensichtlich zeigt auch die Funktion der von Translokationen betroffenen Gene Parallelen zwischen den Leukämien, Lymphomen und Sarkomen einerseits und den Karzinomen andererseits auf. Auch hier wurden Fusionsgene identifiziert, deren einer Teil von gewebespezifischen Transkriptionsfaktoren stammt. So ist im follikulären Schilddrüsenkarzinom häufig der Transkriptionsfaktor *PAX8* transloziert, der normalerweise die Entwicklung von follikulären Zellen der Schilddrüse steuert (Kroll, Sarraf et al. 2000). Weiterhin zeigten Mathur und Samuels, dass Fusionsgene zwischen *TFE3* und variablen Translokationspartnern bei der Initiierung und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps in einer Subgruppe des papillären Nierenzellkarzinoms (RCC) eine wichtige Rolle spielen (Mathur and Samuels 2006). Die Fehlregulation von Transkriptionsfaktoren der MITF-Familie, zu der auch *TFE3* zählt, durch eine gesteigerte Aktivität ist bereits in Melanomen und Sarkomen beschrieben worden (Garraway, Widlund et al. 2005; Davis, Kim et al. 2006).



**Abb. 48** Modell für die Transformation einer Epithelzelle durch ein Fusionsgen und die dafür benötigten Voraussetzungen in Anlehnung an das Modell von F. G. Barr (Barr 1998). A/B: Gene, R: Rekombinationsmaschinerie, AB: Fusionsgen, E: Expressionsmaschinerie, ab: Fusionsgenprodukt, P: phänotypische Effekte, T: Toleranz gegenüber phänotypischen Effekten, mut: zusätzliche Mutationen führen zu Toleranz und Transformation (grau unterlegte Zelle). Der Prozess wird in einer logischen Abfolge dargestellt, die keineswegs eine benötigte Reihenfolge darstellt.

Eventuell könnte man daher die Prinzipien der malignen Transformation durch Fusionsgene, die bisher hauptsächlich anhand von hämatologischen Tumoren und Sarkomen deutlich wurden, auf epitheliale Tumore übertragen und so der Frage nach ihrer Rolle bei deren Entstehung nachgehen.

Ebenso wie die von Barr für die Entstehung von hämatologischen Tumoren geforderte Toleranz müsste das Zusammenspiel von bestimmten zellulären Eigenschaften auch in einer Epithelzelle für eine Toleranz gegenüber einem Fusionsgenprodukt sorgen (Abb. 48). Diese könnte durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen vermittelt werden, die beispielsweise für eine Apoptose-Resistenz und eine Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren sorgen. Solch ein Szenarium zeigten Keller et al. an einem Mausmodell für das humane Rhabdomyosarkom, welches sie nach einem konditionellen *knock-in* des Fusionsgens *Pax3-Fkhr* nur durch die zusätzliche Unterbrechung der Ink4a/ARF- oder Trp53- Signalwege generieren konnten (Keller, Arenkiel et al. 2004). Sowohl die Aktivierung von Onkogenen als auch der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen wurden bereits in humanen Sarkomen beschrieben (Dias, Kumar et al. 1990; Maitra, Wanzer et al. 2001). Möglicherweise könnte ein Mechanismus der Entstehung von Karzinomen ebenso durch Fusionsgene aus Translokationsereignissen und zusätzliche Mutationen in Tumorsuppressorgenen bzw. Onkogenen begründet sein.

## 5 Zusammenfassung

Genetische und epigenetische Veränderungen können Zellen maligne transformieren, indem der programmierte Zelltod, die Zellteilungsrate oder die zelluläre Differenzierung dereguliert werden. Bei der Entstehung von epithelialen Tumoren führt in der Regel erst die Akkumulation von mehreren Defekten zur malignen Transformation einer Zelle, wobei verschiedene Mechanismen, wie Punktmutationen, Chromosomenaberrationen, fokale Deletionen und Amplifikationen zusammen wirken. Strukturelle Aberrationen der Chromosomen und insbesondere balancierte Translokationen werden meist mit der Entstehung von Leukämien, Lymphomen und Sarkomen assoziiert. Sie entstehen durch DNA-Doppelstrangbrüche und eine fehlerhafte Fusion der DNA-Enden. Bei den meisten epithelialen Tumoren ist die funktionelle Bedeutung von Translokationen unklar, sie werden hier jedoch regelhaft und häufig nachgewiesen. Bedingt durch technische Schwierigkeiten konnten bisher nur selten Gene identifiziert werden, deren Funktion durch eine Translokation verändert wurde.

Um die Rolle von Translokationen und anderen strukturellen Chromosomenaberrationen bei der Initiierung und Progression von Karzinomen besser untersuchen zu können, sollte mit dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die in komplex veränderten Genomen chromosomale Bruchpunkte direkt detektieren kann.

Die hier vorgestellte Lösung des Problems basiert auf einer subtraktiven Hybridisierung von Tumorzellgenomen, mit der Translokationsbruchpunkte angereichert und isoliert werden sollten. Um die Subtraktion zu ermöglichen, galt es zunächst die Sequenzvielfalt des humanen Genoms zu reduzieren. Zu diesem Zweck wurde das Genom durch Restriktionsverdau und selektive Amplifikation auf verschiedene Gruppen (Fraktionen) verteilt, die jeweils etwa 10% der genomischen Sequenzvielfalt enthielten. Hierbei ist eine verlustfreie und exakte Aufteilung des Genoms die entscheidende Voraussetzung für die umfassende Identifizierung von Bruchpunkten durch die nachfolgende Subtraktion. Mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll zur Trennung von Restriktionsfragmenten anhand ihrer Differenzierungsbasen wurde diese Anforderung erfüllt. Es gelang, neun von zehn Fraktionen präzise voneinander zu trennen. Zur Überprüfung des Protokolls wurde ein Testsystem entwickelt, in dem die korrekte Zuordnung eines Genomfragments zu einer Fraktion und die anschließende Anreicherung in der Subtraktion kontrolliert werden konnten. Mit den erhaltenen Fraktionen wurde in einem zweiten Schritt ein Subtraktionsprotokoll etabliert, mit dem zugegebene Kontrollfragmente reproduzierbar detektiert wurden. Diese Experimente belegen die grundsätzliche Durchführbarkeit des Vorgehens. Anschließend erfolgte die Erprobung an einzelnen Tumorzellen einer Zelllinie. Hier gelang die Anreicherung eines differentiellen Fragments mit mutmaßlichem Translokationsbruchpunkt zwischen Chromosom 1 und Chromosom 11.

Mit der erarbeiteten Nachweismethode von chromosomalen Bruchpunkten steht ein Mittel zur Verfügung, um in komplex veränderten Karyotypen von Karzinomzellen strukturelle Aberrationen

und die dort lokalisierten Gene nachzuweisen. Da als Ausgangsmaterial für die Methode die DNA einer einzigen Zelle ausreicht, könnte ihre Anwendung an metastatischen Vorläuferzellen in der Zukunft wichtige Erkenntnisse über die Selektion von Tumorzellen und die funktionelle Bedeutung von Translokationen an der systemischen Progression ermöglichen. Ein weiteres Ziel hierbei wäre die Identifizierung von tumorspezifischen Zielstrukturen für neue Therapien.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adeyinka, A., S. Kytola, et al. (2000). "Spectral karyotyping and chromosome banding studies of primary breast carcinomas and their lymph node metastases." *Int J Mol Med* **5**(3): 235-40.
- Anderson, J., S. Gibson, et al. (2006). "Expression of ETV6-NTRK in classical, cellular and mixed subtypes of congenital mesoblastic nephroma." *Histopathology* **48**(6): 748-53.
- Artandi, S. E. and L. D. Attardi (2005). "Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer." *Biochem Biophys Res Commun* **331**(3): 881-90.
- Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, et al. (1999). "Notch signaling: cell fate control and signal integration in development." *Science* **284**(5415): 770-6.
- Arvand, A. and C. T. Denny (2001). "Biology of EWS/ETS fusions in Ewing's family tumors." *Oncogene* **20**: 5747-5754.
- Bailey, S. M. and J. P. Murnane (2006). "Telomeres, chromosome instability and cancer." *Nucleic Acids Res* **34**(8): 2408-17.
- Barr, F. G. (1998). "Translocations, cancer and the puzzle of specificity." *Nat Genet* **19**(2): 121-4.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, et al. (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." *Nature* **434**(7035): 864-70.
- Bassing, C. H. and F. W. Alt (2004). "The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks." *DNA Repair (Amst)* **3**(8-9): 781-96.
- Beheshti, B., B. Vukovic, et al. (2002). "Resolution of genotypic heterogeneity in prostate tumors using polymerase chain reaction and comparative genomic hybridization on microdissected carcinoma and prostatic intraepithelial neoplasia foci." *Cancer Genet Cytogenet* **137**(1): 15-22.
- Bernstein, C., H. Bernstein, et al. (2002). "DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis." *Mutat Res* **511**(2): 145-78.
- Biener, D. (2000). "Entwicklung einer Methode zur direkten Identifizierung struktureller Aberrationen von Tumorzellen." *Diplomarbeit*.
- Billstrom, R., B. Johansson, et al. (1997). "Clonal CD5-positive B lymphocytes in myelodysplastic syndrome with systemic vasculitis and trisomy 8." *Ann Hematol* **74**(1): 37-40.
- Blandford, M. C., F. G. Barr, et al. (2006). "Rhabdomyosarcomas utilize developmental, myogenic growth factors for disease advantage: a report from the Children's Oncology Group." *Pediatr Blood Cancer* **46**(3): 329-38.
- Bowler, L. D. (2004). "Representational difference analysis of cDNA." *Methods Mol Med* **94**: 49-66.
- Boxer, L. M. and C. V. Dang (2001). "Translocations involving c-myc and c-myc function." *Oncogene* **20**(40): 5595-610.
- Caspersson, T., L. Zech, et al. (1970). "Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes." *Exp Cell Res* **60**(3): 315-9.
- Castellanos, A. and E. al. (1997). "A BCR-ABL p190 fusion gene made by homologous recombination causes B-cell acute lymphoblastic leukemias in chimeric mice with independence of the endogenous bcr product." *Blood* **90**: 2168-2174.
- Chen, J., W. O. Lui, et al. (2003). "The t(1;3) breakpoint-spanning genes LSAMP and NORE1 are involved in clear cell renal cell carcinomas." *Cancer Cell* **4**(5): 405-13.
- Coleman, A. E., E. Schrock, et al. (1997). "Previously hidden chromosome aberrations in T(12;15)-positive BALB/c plasmacytomas uncovered by multicolor spectral karyotyping." *Cancer Res* **57**(20): 4585-92.
- Coquelle, A., E. Pipiras, et al. (1997). "Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons." *Cell* **89**(2): 215-25.
- Corless, C. E., M. Guiver, et al. (2000). "Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR." *J Clin Microbiol* **38**(5): 1747-52.
- Corral, J. and E. al. (1996). "An MII-AF9 fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes." *Cell* **85**: 853-861.
- Couedel, C., K. D. Mills, et al. (2004). "Collaboration of homologous recombination and nonhomologous end-joining factors for the survival and integrity of mice and cells." *Genes Dev* **18**(11): 1293-304.

- Counter, C. M. (1996). "The roles of telomeres and telomerase in cell life span." *Mutat Res* **366**(1): 45-63.
- Davis, I. J., J. J. Kim, et al. (2006). "Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MiT family of human cancers." *Cancer Cell* **9**(6): 473-84.
- de Klein, A., A. van Kessel, et al. (1982). "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* **300**(5894): 765-7.
- Debatisse, M., E. El Achkar, et al. (2006). "Common fragile sites nested at the interfaces of early and late-replicating chromosome bands: cis acting components of the G2/M checkpoint?" *Cell Cycle* **5**(6): 578-81.
- Dellas, A., J. Torhorst, et al. (1999). "Prognostic value of genomic alterations in invasive cervical squamous cell carcinoma of clinical stage IB detected by comparative genomic hybridization." *Cancer Res* **59**(14): 3475-9.
- Dias, P., P. Kumar, et al. (1990). "N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS." *Int J Cancer* **45**(4): 593-6.
- Difilippantonio, M. J., J. Zhu, et al. (2000). "DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation." *Nature* **404**(6777): 510-4.
- du Manoir, S., M. R. Speicher, et al. (1993). "Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization." *Hum Genet* **90**(6): 590-610.
- Duesberg, P. and R. Li (2003). "Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations." *Cell Cycle* **2**(3): 202-10.
- Eguchi, M., M. Eguchi-Ishimae, et al. (1999). "Fusion of ETV6 to neurotrophin-3 receptor TRKC in acute myeloid leukemia with t(12;15)(p13;q25)." *Blood* **93**(4): 1355-63.
- Ellisen, L. W., J. Bird, et al. (1991). "TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms." *Cell* **66**(4): 649-61.
- Fang, J. M., M. F. Arlt, et al. (2001). "Translocation breakpoints in FHIT and FRA3B in both homologs of chromosome 3 in an esophageal adenocarcinoma." *Genes Chromosomes Cancer* **30**(3): 292-8.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-67.
- Felske, A. (2002). "Streamlined representational difference analysis for comprehensive studies of numerous genomes." *Journal of Microbiological Methods* **50**: 305-311.
- Ferrucci, P. F., F. Grignani, et al. (1997). "Cell death induction by the acute promyelocytic leukemia-specific PML/RARalpha fusion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20): 10901-6.
- Forozan, F., R. Karhu, et al. (1997). "Genome screening by comparative genomic hybridization." *Trends Genet* **13**(10): 405-9.
- Fountain, J. W., M. R. Wallace, et al. (1989). "Physical mapping of the von Recklinghausen neurofibromatosis region on chromosome 17." *Am J Hum Genet* **44**(1): 58-67.
- Fountain, J. W., M. R. Wallace, et al. (1989). "Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis." *Science* **244**(4908): 1085-7.
- Frame, D. (2006). "Chronic myeloid leukemia: Standard treatment options." *Am J Health Syst Pharm* **63**(23 Suppl 8): 10-14.
- French, C. A., J. L. Kutok, et al. (2004). "Midline carcinoma of children and young adults with NUT rearrangement." *J Clin Oncol* **22**(20): 4135-9.
- French, C. A., I. Miyoshi, et al. (2003). "BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma." *Cancer Res* **63**(2): 304-7.
- Fu, X. and M. P. Kamps (1997). "E2a-Pbx1 induces aberrant expression of tissue-specific and developmentally regulated genes when expressed in NIH 3T3 fibroblasts." *Mol Cell Biol* **17**(3): 1503-12.
- Furuta, J., Y. Nobeyama, et al. (2006). "Silencing of Peroxiredoxin 2 and aberrant methylation of 33 CpG islands in putative promoter regions in human malignant melanomas." *Cancer Res* **66**(12): 6080-6.
- Gadzicki, D., N. von Neuhoff, et al. (2005). "BCR-ABL gene amplification and overexpression in a patient with chronic myeloid leukemia treated with imatinib." *Cancer Genet Cytogenet* **159**(2): 164-167.
- Gao, Y., D. O. Ferguson, et al. (2000). "Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development." *Nature* **404**(6780): 897-900.

- Garraway, L. A., H. R. Widlund, et al. (2005). "Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma." *Nature* **436**(7047): 117-22.
- Giles, G. I. and R. P. Sharma (2005). "Topoisomerase enzymes as therapeutic targets for cancer chemotherapy." *Med Chem* **1**(4): 383-94.
- Graeber, T. G., J. F. Peterson, et al. (1994). "Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status." *Mol Cell Biol* **14**(9): 6264-77.
- Hahn, W. C., C. M. Counter, et al. (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." *Nature* **400**(6743): 464-8.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hansen-Hagge, T. E., U. Trefzer, et al. (2001). "Identification of sample-specific sequences in mammalian cDNA and genomic DNA by the novel ligation-mediated subtraction (Limes)." *Nucleic Acids Res* **29**(4).
- Haruki, N., K. S. Kawaguchi, et al. (2005). "Cloned fusion product from a rare t(15;19)(q13.2;p13.1) inhibit S phase in vitro." *J Med Genet* **42**(7): 558-64.
- Herath, N. I., B. A. Leggett, et al. (2006). "Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis." *J Gastroenterol Hepatol* **21**(1 Pt 1): 15-21.
- Hosch, S., J. Kraus, et al. (2000). "Malignant Potential and Cytogenetic Characteristics of Occult Disseminated Tumor Cells in Esophageal Cancer." *Cancer Research* **60**: 6836-6840.
- Hu-Lieskovan, S., J. Zhang, et al. (2005). "EWS-FLI1 fusion protein up-regulates critical genes in neural crest development and is responsible for the observed phenotype of Ewing's family of tumors." *Cancer Res* **65**(11): 4633-44.
- Hubank, M. and D. G. Schatz (1994). "Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA." *Nucleic Acids Res* **22**(25): 5640-8.
- Hughes, M. M., R. E. Tillman, et al. (2003). "The B12/23 restriction is critically dependent on recombination signal nonamer and spacer sequences." *J Immunol* **171**(12): 6604-10.
- Hughes, M. S., L. A. Beck, et al. (1994). "Identification and elimination of DNA sequences in Taq DNA polymerase." *J Clin Microbiol* **32**(8): 2007-8.
- Jallepalli, P. V. and C. Lengauer (2001). "Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery." *Nat Rev Cancer* **1**(2): 109-17.
- Kalla, C., H. Nentwich, et al. (2005). "Translocation t(X;11)(q13;q23) in B-cell chronic lymphocytic leukemia disrupts two novel genes." *Genes Chromosomes Cancer* **42**(2): 128-43.
- Kallioniemi, A., O. P. Kallioniemi, et al. (1992). "Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors." *Science* **258**(5083): 818-21.
- Kanoe, H., T. Nakayama, et al. (1999). "Characteristics of genomic breakpoints in TLS-CHOP translocations in liposarcomas suggest the involvement of Translin and topoisomerase II in the process of translocation." *Oncogene* **18**(3): 721-9.
- Kasai, M., T. Matsuzaki, et al. (1997). "The translin ring specifically recognizes DNA ends at recombination hot spots in the human genome." *J Biol Chem* **272**(17): 11402-7.
- Keller, C., B. R. Arenkiel, et al. (2004). "Alveolar rhabdomyosarcomas in conditional Pax3:Fkhr mice: cooperativity of Ink4a/ARF and Trp53 loss of function." *Genes Dev* **18**(21): 2614-26.
- Kharas, M. G. and D. A. Fruman (2005). "ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors." *Cancer Res* **65**(6): 2047-53.
- Kim, H. C., S. A. Roh, et al. (2005). "CpG island methylation as an early event during adenoma progression in carcinogenesis of sporadic colorectal cancer." *J Gastroenterol Hepatol* **20**(12): 1920-6.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature* **386**(6627): 761, 763.
- Klein, C. A., T. J. Blankenstein, et al. (2002). "Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer." *Lancet* **360**(9334): 683-9.
- Klein, C. A., O. Schmidt-Kittler, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(8): 4494-9.
- Kolomietz, E., M. S. Meyn, et al. (2002). "The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors." *Genes Chromosomes Cancer* **35**(2): 97-112.

- Kosak, S. T. and M. Groudine (2004). "Form follows function: the genomic organization of cellular differentiation." Genes & Development **18**: 1371-1384.
- Kroll, T. G., P. Sarraf, et al. (2000). "PAX8-PPARgamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]." Science **289**(5483): 1357-60.
- Krzywinski, M., I. Bosdet, et al. (2004). "A set of BAC clones spanning the human genome." Nucleic Acids Res **32**(12): 3651-60.
- Kurimoto, F., A. Gemma, et al. (2001). "Unchanged frequency of loss of heterozygosity and size of the deleted region at 8p21-23 during metastasis of lung cancer." Int J Mol Med **8**(1): 89-93.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler, et al. (1998). "Genetic instabilities in human cancers." Nature **396**(6712): 643-9.
- Lengauer, C., H. C. Riethman, et al. (1992). "Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2." Cancer Res **52**(9): 2590-6.
- Levav-Cohen, Y., Z. Goldberg, et al. (2005). "C-Abl as a modulator of p53." Biochem Biophys Res Commun **331**(3): 737-49.
- Lieber, M. R., Y. Ma, et al. (2003). "Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(9): 712-20.
- Lingle, W. L., W. H. Lutz, et al. (1998). "Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2950-5.
- Lisitsyn, N., N. Lisitsyn, et al. (1993). "Cloning the differences between two complex genomes." Science **259**(5097): 946-51.
- Lombard, D. B., K. F. Chua, et al. (2005). "DNA repair, genome stability, and aging." Cell **120**(4): 497-512.
- Luft, F., J. Gebert, et al. (1999). "Frequent allelic imbalance of tumor suppressor gene loci in cervical dysplasia." Int J Gynecol Pathol **18**(4): 374-80.
- Maitra, A., D. Wazer, et al. (2001). "Amplification of the HER-2/neu oncogene is uncommon in pediatric osteosarcomas." Cancer **92**(3): 677-83.
- Manchester, K. L. (1995). "Theodor Boveri and the origin of malignant tumours." Trends Cell Biol **5**(10): 384-7.
- Mathur, M. and H. H. Samuels (2006). "Role of PSF-TFE3 oncoprotein in the development of papillary renal cell carcinomas." Oncogene.
- May, W. A., M. L. Gishizky, et al. (1993). "Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(12): 5752-6.
- McClintock, B. (1951). "Chromosome organization and genic expression." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **16**: 13-47.
- Michor, F., Y. Iwasa, et al. (2005). "Can chromosomal instability initiate tumorigenesis?" Semin Cancer Biol **15**(1): 43-9.
- Mitelman, F., B. Johansson, et al. (2004). "Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer." Nat Genet **36**(4): 331-4.
- Moynahan, M. E. and M. Jasin (1997). "Loss of heterozygosity induced by a chromosomal double-strand break." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(17): 8988-93.
- Mu, R., L. Chen, et al. (2003). "Genomic Amplification and oncogenic properties of the *KCNK9* potassium channel gene." Cancer Cell **3**: 297-302.
- Nakayama, K., N. Nakayama, et al. (2006). "Homozygous Deletion of MKK4 in Ovarian Serous Carcinoma." Cancer Biol Ther **5**(6).
- Niketeghad, F., H. J. Decker, et al. (2001). "Frequent genomic imbalances suggest commonly altered tumour genes in human hepatocarcinogenesis." Br J Cancer **85**(5): 697-704.
- Paige, A. J. W., K. J. Taylor, et al. (2000). "A 700-kb Physical Map of a Region of 16q23.2 Homozygously Deleted in Multiple Cancers and Spanning the Common Fragile Site FRA16D." Cancer Res **60**: 1690-1697.
- Panagopoulos, I., M. Hoglund, et al. (1996). "Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma." Oncogene **12**((3)): 489-94.
- Pastorian, K., L. Hawel, 3rd, et al. (2000). "Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs." Anal Biochem **283**(1): 89-98.



- Perrotti, D., V. Cesi, et al. (2002). "BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2." *Nat Genet* **30**(1): 48-58.
- Phillips, J. L., B. M. Ghadimi, et al. (2001). "Molecular cytogenetic characterization of early and late renal cell carcinomas in von Hippel-Lindau disease." *Genes Chromosomes Cancer* **31**(1): 1-9.
- Portera, G., M. Venturin, et al. (2006). "Characterisation of a non-recurrent familial translocation t(7;9)(q11.23;p24.3) points to a recurrent involvement of the Williams-Beuren syndrome region in chromosomal rearrangements." *J Hum Genet* **51**(1): 68-75.
- Prabhu, S., D. Saadat, et al. (2006). "A novel mechanism for Bcr-Abl action: Bcr-Abl-mediated induction of the eIF4F translation initiation complex and mRNA translation." *Oncogene*.
- Raghavan, S. C., S. Houston, et al. (2004). "Stability and strand asymmetry in the non-B DNA structure at the bcl-2 major breakpoint region." *J Biol Chem* **279**(44): 46213-25.
- Richardson, C., M. E. Moynahan, et al. (1998). "Double-strand break repair by interchromosomal recombination: suppression of chromosomal translocations." *Genes Dev* **12**(24): 3831-42.
- Ridgeway, A. G. and I. S. Skerjanc (2001). "Pax3 is essential for skeletal myogenesis and the expression of Six1 and Eya2." *J Biol Chem* **276**(22): 19033-9.
- Ried, T., K. Heselmeyer-Haddad, et al. (1999). "Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation." *Genes Chromosomes Cancer* **25**(3): 195-204.
- Roccato, E., P. Bressan, et al. (2005). "Proximity of TPR and NTRK1 Rearranging Loci in Human Thyrocytes." *Cancer Res* **65**(7): 2572-2576.
- Roix, J. J., P. G. McQueen, et al. (2003). "Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas." *Nat Genet* **34**(3): 287-91.
- Romana, S. P., M. Le Coniat, et al. (1994). "t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia." *Genes Chromosomes Cancer* **9**(3): 186-91.
- Rooney, P. H., G. I. Murray, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours." *Br J Cancer* **80**(5-6): 862-73.
- Rowley, J. D. (1973). "A new consistent chromosome abnormality in chronic myelogenous leukaemia detected by quinacrine fluorescence and Giemsa staining." *Nature* **243**: 290-293.
- Royer-Pokora, B., L. Kunkel, et al. (1986). "Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location." *Nature* **322**(6074): 32-8.
- Scheidler, S., W. J. Fredericks, et al. (1996). "The hybrid PAX3-FKHR fusion protein of alveolar rhabdomyosarcoma transforms fibroblasts in culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9805-9.
- Schmidt-Kittler, O., T. Ragg, et al. (2003). "From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7737-42.
- Schrock, E., S. du Manoir, et al. (1996). "Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes." *Science* **273**(5274): 494-7.
- Sengupta, K. and B. J. Rao (2002). "Translin binding to DNA: recruitment through DNA ends and consequent conformational transitions." *Biochemistry* **41**(51): 15315-26.
- Shing, D., D. McMullan, et al. (2003). "FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors." *Cancer Research* **63**(15): 4568-76.
- Siebert, P. D., A. Chenkchik, et al. (1995). "An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA." *Nucleic Acids Res* **23**(6): 1087-1088.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science* **244**(4905): 707-12.
- Snijders, A. M., D. Pinkel, et al. (2003). "Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation." *Brief Funct Genomic Proteomic* **2**(1): 37-45.
- Speicher, M. R., S. Gwyn Ballard, et al. (1996). "Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH." *Nat Genet* **12**(4): 368-75.
- Tognon, C., S. R. Knezevich, et al. (2002). "Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma." *Cancer Cell* **2**(5): 367-76.
- Tomlins, S. A., R. Mehra, et al. (2006). "TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer." *Cancer Res* **66**(7): 3396-400.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, et al. (2005). "Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer." *Science* **310**(5748): 644-8.

- Tonon, G., S. Modi, et al. (2003). "t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway." Nat Genet **33**(2): 208-13.
- Unwin, R., D. Sternberg, et al. (2005). "Global effects of BCR/ABL and TEL/PDGFRbeta expression on the proteome and phosphoproteome: identification of the Rho pathway as a target of BCR/ABL." J Biol Chem **280**(8): 6316-26.
- van Wyk, R., P. Slezak, et al. (2000). "Somatic mutations of the APC, KRAS, and TP53 genes in nonpolypoid colorectal adenomas." Genes Chromosomes Cancer **27**(2): 202-8.
- Wong, N., P. Lai, et al. (2000). "A comprehensive karyotypic study on human hepatocellular carcinoma by spectral karyotyping." Hepatology **32**(5): 1060-8.
- Xia, S. J. and F. G. Barr (2004). "Analysis of the transforming and growth suppressive activities of the PAX3-FKHR oncoprotein." Oncogene **23**(41): 6864-71.
- Yang, H., Q. Li, et al. (2005). "The BRCA2 homologue Brh2 nucleates RAD51 filament formation at a dsDNA-ssDNA junction." Nature **433**(7026): 653-7.
- Yang, T., H. Namba, et al. (1997). "p53 induced by ionizing radiation mediates DNA end-jointing activity, but not apoptosis of thyroid cells." Oncogene **14**(13): 1511-9.
- Zindy, F., R. T. Williams, et al. (2003). "Arf tumor suppressor promoter monitors latent oncogenic signals in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(26): 15930-5.
- Zitzelsberger, H., D. Engert, et al. (2001). "Chromosomal changes during development and progression of prostate adenocarcinomas." Br J Cancer **84**(2): 202-8.
- Zou, J., H. Ichikawa, et al. (2005). "The oncogenic TLS-ERG fusion protein exerts different effects in hematopoietic cells and fibroblasts." Mol Cell Biol **25**(14): 6235-46.

## 7 Anhang

### 7.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Formelgrößen wurden mit den international gebräuchlichen SI-Einheiten und chemische Elemente gemäß ihrer Bezeichnung im Periodensystem abgekürzt.

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
bio	Biotin
bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
C	Cytosin
dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
FCS	Fötale Kälberserum
G	Guanin
h	Stunde
MBN	<i>Mung Bean Nuclease</i>
min	Minute
N	Nukleobase
PCR	Polymerase Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
RT	Raumtemperatur (25°C)
sec	Sekunde
SH	Subtraktive Hybridisierung
T	Thymin
T <sub>anneal</sub>	Annealing-Temperatur
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
WP <sub>1</sub>	Waschpuffer 1
WP <sub>2</sub>	Waschpuffer 2

### 7.2 Adapter und Oligonukleotide

#### 7.2.1 Adapter

Adapter	Langes Oligonukleotid	Kurzes Oligonukleotid
26RA	26RA	R12A
26RAn	26RAn	R13An
26RC	26RC	R12C
26RG	26RG	R15G
26RGn	26RG	R13Gn
26RT	26RT	R13T
26RTn	26RTn	R14Tn
47RT(n)pan	47RT(n)pan	13RT(n)pan
57RT(n)pan	57RT(n)pan	13RT(n)pan
J21	J21	J12
J24An	J24An	J13An
J24Cn	J24Cn	J13Cn
J24Gn	J24Gn	J13Gn
J24Tn	J24Tn	J13Tn
Lib1	Lib1	ddMse11
R21	R21	R12

## 7.2.2 Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5'→3'	Modifikation*
13RT(n)pan	TAA TGC CCT CCG C	3'ddC
23R'Am	TCA ATC AGC TGC GCT TGT TTA AA	
23R'C	TCG CAC TCG ACT ATC CTC TGG TT	
23R'Cm	CAC TCG ACT ATC CTC TGG TTA AC	
23R'G	GAG CAA ATG ACC ATG CTA GCA CC	
23R'Gm	AAT GAC CAT GCT AGC ACC TTA AG	
23R'Tm	CTC GGC TCA ACG TCA GGA TTA AT	
23R'An	AAT TCG TCA ATC AGC TGC GCT TG	
23R'Tn	TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AT	
26RA	AAG TCG TCA ATC AGC TCC GAT CGT TT	5'Bio, 5'Dig
26RAn	AAT TCG TCA ATC AGC TGC GCT TGT TT	5'Bio, 5'Dig
26RC	CTA TCG CAC TCG ACT ATC CTC TGG TT	5'Bio, 5'Dig
26RG	TCT GAG CAA ATG ACC ATG CAG CAC C	5'Bio, 5'Dig
26RT	GTT AAG TCT CGG ATC AAG CTC AGG AT	5'Bio, 5'Dig
26RTn	GTA TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AT	5'Bio, 5'Dig
23R'Tnpan	TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AG	
18R'Tnpan	TAG TCT CGG CTC AAC GTC	
47RT(n)pan	GTA TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AGG TCG CGT GGT GCG GAG GGC AT	5'Bio
57RT(n)pan	GTA TAG TCT CGG CTC AAC GTC AGG AGG TCC GA TGC GG TCG CGT GGT GCG GAG GGC AT	5'Bio
ddMse11	TAA CTG ACA G	3'ddC
J12	TAA GCG GTG AGG	3'ddC
J13Nn, N=A,G,T,C	TAA NGT CTG AGA C	3'ddC
J20n	TAG GTT CCA GCG TCT CAG AC	
J21	AGT CTC CAG GCT CTC ACC GCT	
J24Nn, N=A,G,T,C	TGT AGG TTC CAG CGT CTC AGA CNT T	
Lib A	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AA	5'Bio, 5'Dig
Lib Am	GAT TCC TGC TGA GAG TTA AA	5'Bio, 5'Dig
Lib Am2	GAT TCC TCG TGT CAG TTA AA	
Lib Am3	GAT TCC TGC TGT GAG TTA AA	
Lib C	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AC	5'Bio, 5'Dig
Lib Cm	GAT TCC TGC TGA GAG TTA AC	5'Bio, 5'Dig
Lib G	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AG	5'Bio, 5'Dig
Lib Gm	GAT TCC TGC TGA GAG TTA AG	5'Bio, 5'Dig
Lib Gm2	GAT TCC TGC TGA GTG TTA AG	
Lib Gm3	GAT TCC TGC TGT ACC TTA AG	
Lib T	GAT TCC TGC TGT CAG TTA AT	5'Bio, 5'Dig
Lib Tm	GAT TCC TGC TGA GAG TTA AT	5'Bio, 5'Dig
Lib Tm2	GAT TCC TGC TGA CAG TTA AT	
Lib Tm3	GAT TCC TGC TTA CAG TTA AT	
Lib1	AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	
R12	TAA GTC ACT GGA	3'ddC
R12C	AAC CAG AGG ATA	3'ddC
R13An	AAA CAA GCG CAG C	3'ddC
R13Gn	T TA AGG TGC TAG C	3'ddC
R12A	AAA CGA TCG GAG	3'ddC
R13T	ATT AAT CCT GAG C	3'ddC
R14Tn	TAA TCC TGA CGT TG	3'ddC
R15G	CTT AAG GTG CTA GC	3'ddC
R21	GAC CTC GAC TAT CCA GTG ACT	
GFP mut II 5'	GCA CCA TCT TCT TTA AGG AC	
GFP mut II 3'	GGC CGC TTT AAT TGT ACA GC	
GFP II N5', N = T, C, G	GTT AAN GGA CGA CGG CAA CT	
GFP II N3', N = A, C, G	GTT AAN TGT ACA GCT CGT CC	
GFP mut I 5'	GCT GGA CGG CG ACT TAA ACG	
GFP mut I 3'	TGG CGG ATC TTA AAG TTCA CC	
GFP I N5', N = T, C, G	GTT AAN CGG CCA CAA GTT CA	
GFP I N3', N = T, C, G	GTT AAN GTT CAC CTT GAT GC	
050623 AGTR 5'	CAG GAG ATG AGA GTT CCA GA	
050623 AGTR 5'	GTA CCA GGT GCA AGT GTA GC	
BCR-ABL 5'-N, N = A, T, C, G	CTG GAT TTA ANA GAG TTC A	
BCR-ABL 3'-N; N = A, T, C, G	GAAAATCCTTAAGGTTATTTCTG	

\*: 3'-Modifikation obligat; Oligonukleotide mit 5'-Modifikation waren auch ohne Modifikation vorhanden

### 7.2.3 Oligonukleotide für die spezifische Kontroll-PCR

Primer-Paar	D*	Frag-ment** [bp]	Gen/ Position Marker [Ensembl 12/05]	Primer	Sequenz 5'→3'	T*** [°C]	PCR- Produkt [bp]
D5S2117	AA	1376	133065027 - 133065242	5'	CCA GGT GAG AAC CTA GTC AG	58	140
				3'	ACT GAG TCC TCC AAC CAT GG		
050407 AA 751	AA	751	BCR	5'	GAC CAT TCA GTG GTG GTT AG	61	247
				3'	GCT CTA AGA ACT CTG TCA CC		
D17S855	AA	594	38458270-38458420	5'	GGA TGG CCT TTT AGA AAG TGG	60	150
				3'	ACA CAG ACT TGT CCT ACT GCC		
rs14214	AA	568	PDPR	5'	AAT CTT CTG TGG CCC ACA GT	55	144
				3'	GAC CCT TAT TGA CTA CAC TGG		
Exon 8/9	AA	558	P53	5'	AGG ACC TGA TTT CCT TACTGC	58	373
				3'	GAG GTC CCA AGA CTT AGT AC		
D17S1161	AA	316	53686418-53686584	5'	CAG TTA GCC AAG ATA ATG CC	58	200
				3'	CTC ATA AGG GGA TAA AGG AC		
rs1046910	AA	247	Q9UPV9	5'	GGG AGA ACA ATG AAT TGG CTC	55	215
				3'	GAC CAG ACC ACC ATG GAT AC		
rs3196165	AA	128	Q9UPV9	5'	TAG AAC CAG GAA AGG CTC AG	55	112
				3'	CAC TTT GAA CAC ATG TGT AAG C		
BCR- TT1936	TT	1936	BCR	5'	CGT GGA CAA CTA CGG AGT TG	61	323
				3'	TCA GCC TCA GGA CTC TTG TG		
D16S3066	TT	536	71887336-71887531	5'	GCT GTT AAC ATG AAA CAA TTG CC	58	198
				3'	GGG GTC TAA TGG TTC AGC C		
BCR-TT	TT	508	BCR	5'	CAC TAG TTG TCC CTG CTC AG	58	234
				3'	GTC CAGTCA CTT GTG GTC TG		
rs2049281	TT	294	CLASP2	5'	CTG GCT GCA ATC AAA ATG CAA	58	195
				3'	GAA GGC TTG ATC ATG CCA GT		
D6S314	TT	277	140056224 - 140056474	5'	TAA TCC ACT TCC TGA CCT AG	60	212
				3'	CTT CCC AGG TGA TTC TCA TG		
rs3762171	TT	261	COG4	5'	ACA CAA AGT GGC ATG GAC CT	55	220
				3'	AAC CCA GCA GTG GGA AGA TC		
TFR	TT	242	TFR	5'	GCA TGA AAG ACA TAG GAG GC	58	130
				3'	CAG GCA ACC CAA GTA AGA GAT		
TOP2B	TT	209	TOP2B	5'	GAG ACT TGC CCG AAG ATG GT	58	174
				3'	CTA CTT GTA GGT AGG CTG CTA		
abl-TT 2	TT	173	ABL1	5'	CAT CGT TCA TGATGG CAA GG	58	125
				3'	GAA ATG TAC TGC GTT ATG CC		
D5D500neu	TT	159	137874849-137875060	5'	CTT TTT ACA TTT TTG GTA CCT TG	58	130
				3'	GTA TCG GTG AAA TGC AAC TA		
abl-TT1	TT	157	ABL1	5'	TTA TAC TAG ATC TTG AGC ACC	60	142
				3'	CCC TCA TAA CTA CAA GAA CTC		
BCR- CC1233	CC	1233	BCR	5'	TTC GGT CCT TGC AGC AGA TC	61	413
				3'	GTT GGG CAG AAT CTG AAC CTC		
abl-CC	CC	291	ABL1	5'	AGC TAC TTA GTG AAT AACG CAG	58	271
				3'	GAT CAG GTT GAG TAA ATG TCC		
050329 CC 203	CC	203	ABL1	5'	GTG ATG ATC ATG CAC CTT AC	59	150
				3'	CAC AGG GAA CTA CAC TGC		
BCR-GGIII	GG	1026	BCR	5'	ACC GTC ATC GCC ATG AAT GG	60	297
				3'	CCA GGT CCC TGA GTG GAG		
050407 GG 944	GG	944	BCR	5'	CGG TGC CTG CAT GTA TCT TG	61	360
				3'	ATT AGC CTG GGA GGA GAC C		
BCR-GGII	GG	715	BCR	5'	TGT CAG GAA TTG TCA GTC AC	60	470
				3'	AGC AGA CCT CTT AGC TGC TC		
D16S3019	GG	605	64686681 - 64686928	5'	CAA CTC ATT CCC TGT GTG AC	57	265
				3'	AAC CAA GTG GGT TAG GTC AG		
BCRG-GG	GG	367	BCR	5'	CTG GTC TCA GGT GAC TCT GA	58	329
				3'	TAT CTT GGC TAG TAG GTG TGC		
D5S592	GG	348	119129568 - 119129746	5'	GTC AAC AAA GTA ATG TAA AGA CAG	58	186

				3'	TGG AGT GGA GAG CGT CTC AG		
050329 GG 142	GG	142	BCR	5'	AGA ATG GAA GAG TTC CTG GC	61	138
				3'	ATG TTC CAG GTG TGG GCA G		
AT1453	AT	1453	BCR1	5'	ATA GGG TCT GTG TTG CCC AG	BQ68	272
				3'	CTT GGC TAC CTG TCA GCA TC		
AT954	AT	954	BCR1	5'	CTT CAG CCC AGG AAT TCA G	n.f.	381
				3'	ATG TTG GTC AGG CTG GTC		
AT790	AT	790	BCR1	5'	TGC AGG GGT ATG ATC ATA GC	BQ64	583
				3'	CTT CTC ATG CCT CAA AGC C		
AT701	AT	701	BCR1	5'	AGC TCA CGC CTG TAA TCC C	BQ66	346
				3'	ATA AGA ACA CTT GCT CCA GCC		
BCR-AT	AT	600	BCR	5'	CCA TTG AGG GCT GGG TGC A	64	358
				3'	GAG AAC ATT CCT GCC CTG GA		
D5S299	AT	550	101675106-101675264	5'	GCT ATT CTC TCA GGA TCT TG	58	170
				3'	GTA AGC CAG GAC AAG ATG ACA G		
rs2293250	TA	394	UBP1	5'	TCA GGT TTA CAG ACA GGG TC	55	180
				3'	CCC AAC TCT CTG AAA ATG ATT C		
D5S346	AT	350	112241523 - 112241647	5'	ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG	60	110
				3'	AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T		
D5S815	AT	307	135329409 - 135329651	5'	TTG CCA CTG AAA ATC ATA TCC	58	170
				3'	CAG TGT CCC AGA CTC AGA C		
D16S3040	AT	302	78209120 - 78209232	5'	CTG CAA CAA GAA AGA TAC TCC	59	146
				3'	AGT GCC TCA CAG GCT GCC		
rs969818	TA	228	Q9UBL0	5'	ATG AAG ACG AGG CTG GTG TA	55	170
				3'	TGG CAG TCT GAG AAT GCT TC		
rs2278031	AT	220	AP1G1	5'	TAA AGT TCT GAA CCC TCA GAA G	56	220
				3'	TAA GAT GCC ACT AAG CCA CCT		
D6S1569	AT	158	139095443 - 139095572	5'	ATT CCT TTA GAG GAA CAA TGA	57	95
				3'	CTA GTA TGC AAG AAA CTG CTA G		
rs6441857	CA	648	ZNF167	5'	CTA ACG GGC AGT AGA GTG TC	61	260
				3'	CAC GTC TGC CCT GTT CAT CG		
rs2296408	CA	637	CDH3	5'	AGC TTC TGC TCT CAG AGT CA	57	220
				3'	CAT GAG GAT GAT GCC ATC TAC		
BCR-AC	AC	576	BCR	5'	CAT AAG GGT GTG AAG AAC TG	60	388
				3'	CTG TGA GAC TAG CCG TGC A		
D6S453	AC	479	141422886 - 141423067	5'	ACC TGG CTG AGG TAG GAC T	58	146
				3'	ACT ATG GCT ACT AAT TGT GAC T		
AGTR 279	AC	279	AT1AR	5'	CAG GAG ATG AGA GTT CCA GA	60	105
				3'	GTA CCA GGT GCA AGT GTA GC		
D6S1633	AG	1317	157067113-157067239	5'	CTC ATG GAG CTT ATA GCC TG	59	266
				3'	TGT TCC TTC TGG CTA GCA TG		
BCR-3' + K562 5'III	AG	1020	BCR	5'	AGG AAG GAC TCA TCG GGC AG	60	174
				3'	CCC AGG ATC TGA GAC AGG CT		
rs3816945	AG	682	Q9UF96	5'	AGA CTT CTG GGC CTG GAA C	59	130
				3'	GAG GTA GAA TGC TTC CTC AG		
rs1801552	AG	486	CDH1	5'	GAA GCC AAA GAT GGC CTT AG	55	180
				3'	CCA GAA TGG CAG GAA TTT GC		
rs699444	AG	480	ATBF1	5'	CAT GAG TTG AGG ACC TTC AG	56	145
				3'	AAC CTC AAG CCT TGC AGA TC		
D5S399	AG	485	135991437 - 135991552	5'	ACG GAA CTT CAA TTG ACC TC	58	178
				3'	GCA GGC TGT GGC CTC AAC		
D3S32	AG	394	not mapped	5'	GTG TCC AGG GTT CTC CTA G	58	300
				3'	GCA GCC ATG TGC TTC CTG C		
rs12638282	AG	370	Q9NW15	5'	CCT GTT TGC ATT GTG GTG AC	55	190
				3'	CAG TAT CCA TAT TAC GTT TCT C		
D17S800	AG	333	36309949 - 36310120	5'	CTT ATG GTC TCA TCC ATC AGG	61	140
				3'	GAC AGA AAG ATG GAT AAG ACA AG		
Exon 5/6 II	TC	1032	P53	5'	TGC TGC CGT GTT CCA GTT GC	64	460
				3'	ACC AGA CCT CAG GCG GCT CA		
rs1047855	CT	651	ENTPD3	5'	TGG CTA CAT GCT CAG CCT GA	61	290
				3'	GGC AGC CAC TTC ACC TGC AT		
rs740178	TC	576	ATBF1	5'	CTG ACA TCC AAC AGC TTT ATG G	56	170

				3'	GTA CTG ACC CAG AGT CAC TG		
rs2281850	CT	552	CDH3	5'	CAG AAC AAA CGT TGG CCA TG	59	119
				3'	ACA CTG CAG AAG ACC CTG AC		
D5S1360	TC	513	144877829 - 144877967	5'	ACA AAC AAA ACC AAG AGT GC	55	130
				3'	TGG CTC ATG TAT CCC TAT GT		
D6S308	CT	262	141298417 - 141298615	5'	GCC TTG GAG AGA AAT TCA CGT A	61	214
				3'	GGC CTC ATA GTC TAA TCA CTG		
Blue cone	TC	283	BOP	5'	GAC TCT ACC CAG GTT TCT AG	60	76
				3'	CTG TGC TTA CCA AAG GCT TC		
GT1351	GT	1351	BCR1	5'	CTG TCA CTA CTG TCC ATC TC	BQ62	679
				3'	GCA AAG GTG CTC AGC CAG		
TG1068	GT	1068	BCR1	5'	ACA GCC TAG GCT ATT CAC TT	58	300
				3'	ACA AAA TCA CGC CTG GCT G		
GT881	GT	881	BCR1	5'	GAG TGA GCT CAT GTT CAT CC	62	379
				3'	CCG CTT TAG TGG ACT CCA G		
TG756	GT	756	BCR1	5'	GTG GAG CTG TTC TCA CTC AG	62	376
				3'	CAT GTG GCT CGA TGG CTT CT		
BCR-GT	TG	670	BCR	5'	TGC CAG TTC AGA CCC TTA TG	58	192
				3'	CTC ACT CAG TTT GTC CTC AG		
D5S615	TG	641	125191192 - 125191538	5'	GGT AAA CCC TCA AGC AGT C	57	265
				3'	AAC CAG TTT CTT ATT ATA AGC C		
APC V	TG	618	APC	5'	CAA GGA AAC CAA GTC AGC TGC	57	330
				3'	GCT TTA TTG TCA TCC AAT TCA G		
rs1714414	TG	600	MYRIP	5'	GCA TTA TTG TGG GAC CTC ATG	57	174
				3'	CAA AAA GGC TTC CTC CTG GCA		
D17S943	TG	260	45195357 - 45195549	5'	CAC GTT GGC TGC AAT GCC C	60	176
				3'	CTG TCT CAT TCC AAC CAT CG		
Chr16-TG	TG	250	77940285 - 77940529	5'	CACCTGTTGCATAGTGAGTAC	64	172
				3'	GGC CCT AGA TCT GGT GAA G		
CCK	GT	231	CCK	5'	ACT ACA TGG GCT GGA TGG AT	60	109
				3'	TCT GGG TTG GGA GGT TGC T		
rs17345313	GT	216	ZNF19	5'	GAA TTG GGT AGG GAG ATT CCA	56	131
				3'	ACA CTG CAG AGA TCT CTC AG		
D16S485	TG	179	70292497-70292791	5'	AGT AAT AAT GTA CCT GGT AAC	57	150
				3'	AGG CAA TTT GTG TCC CCC GAC		
BCR-GC	GC	1071	BCR	5'	TTG TAG ATG CGG ATG CTG ACT CC	60	258
				3'	TCA CCT GGA CCC TTG CCA ACT		
rs8051212	GC	417	ZNF23	5'	CCA AGT ACT GTA CTT TAG GTA G	55	290
				3'	GCT CCT GAC ATA GGG TCA TG		
rs2290134	GC	355	Q9UPV9	5'	TCG TCC AGG TCA ACA TCC AG	56	230
				3'	AGG GGT TCA CGC TAA GCA CT		
rs1565957	GC	298	Q9UF96	5'	ACT TTG CAT GGT ATT ACC CAG	55	145
				3'	ACC TTG TGC AAA GAA TGA		
HER2 226	GC	226	C-erbB-2	5'	GCT CAG CAC ATG GAA GCA AG	58	133
				3'	GGA TCA AAG GCA CCT ATC AG		
D5S471	GC	188	119076934-119077176	5'	GTT TTC ACA CAT TTT CCC AGC	60	136
				3'	GTT ACA ACA AAT AGC AAC AGC		
GFP forw	NN	450	GFP	5'	TAT ATC ATG GCC GAC AAG CA	59	173
rev n				3'	CTC AGG GCG GAC TGG GTG C		
K562	NN	201	t(9;22) BCR-ABL	5'III	AGG AAG GAC TCA TCG GGC AG	58	122
				3'	TCT GTT TGG GTA TGG AAG CTG		
GFP-test	NN	440	GFP	5'	GAC CCT GAA GTT CAT CTG CA	58	314
				3'	TGT TGT AGT TGT ACT CCA GCT		

\*: Differenzierungsbasen; \*\* Mse I-Fragment; \*\*\*: Annealing-Temperatur, wenn nicht anders angegeben: PCR-Programm BP

## 8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich sehr herzlich für die Bereitschaft, sich als Doktorvater dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen und sie als Erstgutachter an der Biologischen Fakultät der LMU München zu vertreten. Für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christoph A. Klein für die kompetente Betreuung der Arbeit, seinen Einsatz für das Fortkommen des Projekts, die umfassende Unterstützung in fachlichen und praktischen Fragen und eine gute persönliche Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Brocker danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Immunologie der LMU München durchzuführen.

Isabell Blochberger und Barbara Lindner möchte ich ganz besonders für ihre Mitarbeit danken, ohne die das Projekt nicht hätte durchgeführt werden können. Ihre kompetente und verlässliche Arbeitsweise war mir eine enorme Hilfe und die Zusammenarbeit mit ihnen hat sowohl auf fachlicher als auch auf persönlicher Ebene viel Freude gemacht. Dorothee Biener, Manfred Meyer und Simone Pentz danke ich für die Einführung zu Beginn meiner praktischen Arbeit, womit sie mir den Einstieg in den Laboralltag erleichterten. Weiterhin bedanke ich mich bei Mani Meyer für die Lösung vieler Labor- und Computerprobleme. Allen Arbeitsgruppen-Mitgliedern und Angehörigen des Institutes möchte ich für die Hilfestellungen danken, die ich von ihnen erhalten habe.

Für das wiederholte kritische Lesen der Dissertation und die wertvollen Anmerkungen bedanke ich mich herzlich bei Christian Vay, Bernhard Polzer und Isabell Blochberger. Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die schöne Zeit danken, die wir insbesondere in Tiers zusammen hatten, und die vielen gemeinsamen Unternehmungen innerhalb und außerhalb des Labors, die das tägliche Zusammenarbeiten so angenehm gemacht haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich mit uneingeschränkter Unterstützung vor und während meiner Zeit als Doktorandin begleitet haben. Ihr seid die Besten! Auch meinen Freunden danke ich herzlich dafür, dass sie da waren und sind und immer ein Ohr für meine Belange haben.



## 9 Lebenslauf

Susanne Steinhaus

Geboren am 26.10.1974 in Köln

seit 09/2001	Promotionsarbeit zum Dr. rer. nat. in der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Klein am Institut für Immunologie der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München: „Eine Methode zur direkten Identifizierung von chromosomalen Translokationsbruchpunkten“.
10/2000	Diplomprüfung an der Biologischen Fakultät der LMU München (Note: 1,1)
01/2000 - 10/2000	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Physikalische Biologie (Prof. Dr. R. Uhl) am Botanischen Institut der LMU München: „Der Einfluss chemotropher Substanzen auf den F-Actingehalt und das Wachstum neuronaler Wachstumskegel“ (Note: 1,0)
06/1999 - 01/2000	Hilfswissenschaftlerin in der Arbeitsgruppe Physikalische Biologie, LMU München
10/1997 - 05/2000	Hauptstudium der Biologie an der LMU München (Schwerpunkt Humangenetik)
10/1995 - 09/1997	Grundstudium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg; Abschluss mit dem Vordiplom (Note: 1,8)
10/1994 - 09/1996	Grundstudium der Neueren Deutschen Literatur und Medienwissenschaften an der Philipps-Universität Marburg
06/1994	Allgemeine Hochschulreife, Georg-Büchner-Gymnasium Köln-Weiden (Note: 1,7)